

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU MÉTABOLISME ET DE L'ÉLIMINATION
DE L'ION NITRATE CHEZ L'HOMME**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON, le 11 Décembre 1961

par

ROUX François

né le 16 Septembre 1933

à Montélimar (Drôme)

Travail de la Division de Chimie du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées

F, ANDRE
5, rue Bugeaud
LYON

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU MÉTABOLISME ET DE L'ÉLIMINATION
DE L'ION NITRATE CHEZ L'HOMME**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de Pharmacie

**présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON, le 11 Décembre 1961**

par

ROUX François

né le 16 Septembre 1933

à Montélimar (Drôme)

**Travail de la Division de Chimie du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées**

**F, ANDRE
5, rue Bugeaud
LYON**



Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire

M. H. HERMANN : Doyen,
Correspondant de
l'Institut

M. M. LEVRAT, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie Cardio- Vasculaires
CROIZAT	Clinique Médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
POLLOSSON	Clinique Gynécologique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique Médicale A
SOHIER	Hygiène et Action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique Stomatologique
BERNHEIM	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et Pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et Cryptogamie
BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique

MM.

DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie
CREYSSSEL Jean	Clinique Traumatologique des Membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie Pathologique
GIRARD Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie Médicale
GALY	Physio-Pathologie des Voies respiratoires
KEHL	Histologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
MONNET	Bactériologie

MM.

Professeurs à titre personnel

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
DORCHE	Technologie Pharmaceutique

MM.

Professeurs sans chaire

BANSSILLON	Obstétrique
ROMAN	Parasitologie
BERTOYE	Bactériologie
CIER J.François	Physiologie
CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
PERROT	Chimie organique et Toxicologie

MM.

Maîtres de Conférences-Agrégés

FEROLDI Jacques	Anatomie pathologique
CREYSSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie

MM.

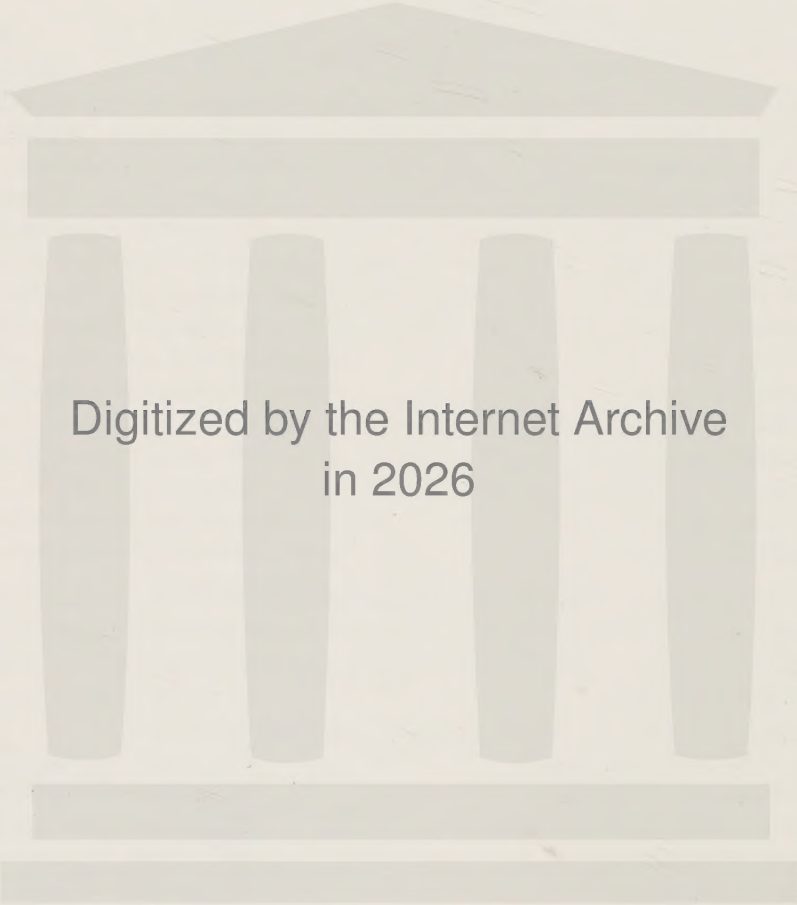
THIVOLET Jean	Anatomie
GARIN Jean-Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique
ODDOUX Lucien	Botanique et Cryptogamie

MM. Agrégés en Exercice

LECUIRE Jean	Chargé d'enseignement	Neuro-Chirurgie
MATHIEU Jacques		Obstétrique
MARION Joseph		Orthopédie
PONT Maurice	Chargé d'enseignement	Propédeutique Médicale
VIGNON Georges	" "	Pathologie Médicale
REVOL Louis	" "	Pathologie Médicale
JAUBERT DE BEAUJEU	" "	Pathologie Chirurgicale
GUILLEMIN Georges	" "	Propédeutique Chirurgicale
BURTHIAULT René	" "	Obstétrique
FRANCOIS René	" "	Pédiatrie, Puériculture
GUINET Paul		Médecine Générale
SAUTOT Jean		Pathologie Chirurgicale
MARION Pierre		Chirurgie Générale
MICHAUD Pierre		Chirurgie Générale
GIGNOUX Marcel		Oto-Rhino-Laryngologie
FREIDEL Charles		Stomatologie
PLAUCHU Marcel		Médecine Générale
TRAEGER Jules		Médecine Générale
DEVIC Michel	Chargé d'enseignement	Pathologie Médicale
COLIN Marcel	" "	Médecine Légale
GUYOTAT Jean	" "	Neurologie
DUMONT Martial	" "	Obstétrique
DURAND Louis	" "	Urologie
de MOURGUES Georges	" "	Chirurgie Générale
DESPIERRES Charles	" "	Médecine Générale
FRANCILLON Jacques		Chirurgie Générale
TOLOT François		Médecine du Travail
SAUBIER Eugène		Chirurgie Générale
COLOMB Daniel		Dermatologie
SCHOTT Bernard		Neurologie, Psychiatrie
BONAMOUR Georges		Ophthalmologie

Examineurs de la Thèse

MM. DREVON
BADINAND
DORCHE
CIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

en témoignage de mon affection
et de ma profonde gratitude

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur B. DREVON

Nous avons apprécié à la Faculté son enseignement qui constitue la base de notre culture pharmaceutique.

Il nous fait le très grand honneur d'accepter la Présidence de notre Jury.

Qu'il nous permette de lui adresser l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Tout au long de nos études, il a été pour nous un guide bienveillant.

Il a bien voulu nous accueillir parmi ses élèves à la Faculté où nous avons apprécié la richesse et la clarté de son enseignement en même temps que son jugement très sûr.

Il nous fait l'honneur aujourd'hui de compter parmi nos Juges. Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre dévouée affection.

Monsieur le Professeur J. DORCHE

Ses qualités professionnelles et morales, l'étendue de ses connaissances et sa grande courtoisie font que nous gardons un excellent souvenir de notre semestre d'interne passé dans son laboratoire hospitalier.

Nous avons souvent recours à ses conseils et nous connaissons la cordialité de son accueil, allié à la plus grande délicatesse.

Aujourd'hui, nous sommes très heureux de le compter parmi nos Juges. Nous l'en remercions très respectueusement.

Monsieur le Professeur A. CIER

Il nous a accueilli dans son laboratoire, il nous a confié ce travail dont il a suivi pas à pas la progression.

Il n'a pas cessé de nous prodiguer ses conseils et son aide, ne ménageant ni son temps, ni sa peine.

En nous permettant de présenter aujourd'hui ce travail sous forme de thèse, il nous prouve sa confiance.

Qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre respectueux attachement et de notre sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur agrégé R. MALLEIN

Nous avons souvent eu recours à ses connaissances au cours de nos études et de notre Internat.

Qu'il soit ici amicalement assuré de notre gratitude.

Au Pharmacien Capitaine C. NOFRE

Ses conseils, ses connaissances et ses encouragements nous ont profondément aidé dans l'élaboration de ce travail.

Nous tenons à le remercier et à l'assurer de notre amitié.

A la mémoire de Paul-André BARBIER

A nos camarades de l'Internat en Pharmacie des Hôpitaux
de Lyon

A nos camarades du Laboratoire

INTRODUCTION

Les propriétés diurétiques des nitrates alcalins sont connues depuis fort longtemps ; dès 1679, Thomas WILLIS (91) recommandait à ce titre l'emploi du "sel de nitre", le nitrate de potassium.

Sans doute, la diurèse provoquée par l'administration de ce sel est-elle liée à la présence de potassium dans sa molécule et le nitrate peut être sans inconvénient remplacé par le chlorure de potassium ; à doses équivalentes, les effets sont sensiblement identiques. (MAGNUS, LEVY et BLUM) (11).

Il n'est pas possible cependant de généraliser et d'admettre que la substitution des ions nitrates par des ions chlorures ne saurait modifier en rien l'activité pharmacodynamique d'une molécule active. Le rôle de l'anion salifiant a pu être mis en évidence dans diverses séries pharmacologiques et, de préférence au chlorure, le nitrate de sodium qui figure encore à la Pharmacopée de 1937 a été également préconisé comme diurétique salin à des doses de 2 à 10 grammes par jour.

Une telle posologie pose un autre problème : des doses aussi massives sont-elles encore concevables après l'observation de phénomènes toxiques qui ont pu être rapportés chez l'enfant à la présence de nitrates alcalins dans l'eau utilisée pour l'allaitement artificiel et chez l'adulte à l'administration orale de nitrates généralement insolubles ?

Dans les deux cas, la réduction de l'ion nitrate en nitrite serait responsable des intoxications, dont certaines fort graves, qui ont été signalées. Mais que sait-on du métabolisme "normal" de l'ion nitrate chez l'homme ?

Les données bibliographiques que nous avons retrouvées sont d'une portée limitée et font état le plus souvent de résultats discordants.

La pauvreté des observations réunies dans ce domaine contraste singulièrement avec le développement remarquable que connaissent ces dernières années les recherches ayant trait au métabolisme de l'azote nitrique chez les végétaux et nous a incités à reprendre cette étude.

Il ne faut sans doute pas chercher une explication dans les difficultés que représente le dosage des nitrates dans les milieux biologiques. Il s'agit cependant d'un problème analytique délicat, particulièrement en biologie animale, et notre expérimentation a dû débiter par la recherche d'une technique suffisamment sensible et spécifique, applicable au dosage de traces de nitrates et de nitrites dans le sang et l'urine.

Voici d'ailleurs le plan que nous avons suivi pour l'exposé de ce travail.

Première Partie

GENERALITES

Chapitre I.1.- RAPPEL PHYSICOCHIMIQUE SUR LES COMPOSES MINERAUX DE L'AZOTE

- I.1.1. - Le degré d'oxydation des composés minéraux de l'azote.
- I.1.2. - Les structures électroniques des composés minéraux de l'azote.
- I.1.3. - Propriétés physicochimiques des nitrates et des nitrites.

Chapitre I.2.- LA REDUCTION DES NITRATES EN BIOLOGIE

- I.2.1. - Chez les végétaux et les micro-organismes.
- I.2.2. - Chez les animaux supérieurs.

Chapitre I.3.- TECHNIQUES DE DOSAGE DES NITRATES

- I.3.1. - Méthodes basées sur des réactions de nitration.
- I.3.2. - Méthodes basées sur des réactions d'oxydo-réduction.
- I.3.3. - Méthodes de réduction.
 - I.3.3.1. - Réduction des nitrates.
 - I.3.3.2. - Réduction des nitrates en nitrites.

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre II.1. - TECHNIQUES UTILISEES

- II.1.1. - Dosage des nitrates dans les milieux biologiques. Méthode proposée.
 - II.1.1.1. - Facteurs influençant ou susceptibles d'interférer dans la réaction.
 - II.1.1.2. - Applications.
- II.1.2. - Dosage des nitrites dans les milieux biologiques.
 - II.1.2.1. - Dans l'urine et la salive.
 - II.1.2.2. - Dans le sang.

Chapitre II.2. - ETUDE DU METABOLISME DES NITRATES ALCALINS. RESULTATS.

- II.2.1. - Essai de réduction in vitro par les tissus animaux.
- II.2.2. - Mode d'élimination des nitrates.
 - II.2.2.1. - Elimination normale
 - II.2.2.2. - Elimination après surcharge (Ingestion)
(Injection).

Chapitre II.3. - DISCUSSION DES RESULTATS

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

Première Partie

GENERALITES



CHAPITRE I

I.1 - RAPPEL PHYSICOCHIMIQUE SUR LES COMPOSES MINERAUX DE L'AZOTE

Dans ce chapitre (*), nous envisagerons successivement les différentes valeurs du degré d'oxydation que l'on peut attribuer aux composés minéraux de l'azote et la structure électronique actuellement admise pour ces composés; nous rappellerons enfin quelques propriétés physicochimiques essentielles des nitrates et des nitrites.

Ces données nous paraissent nécessaires pour expliquer par quels processus s'effectue le passage des nitrates à l'ammoniaque et pour comprendre par quels intermédiaires se réalisent les mécanismes de réduction.

I.1.1. - LE DEGRE D'OXYDATION DES COMPOSES MINERAUX DE L'AZOTE (**)

La conversion de l'ion nitrate en ammoniaque est le résultat d'une série de réactions d'oxydo-réduction où l'atome d'azote initialement de degré d'oxydation + 5 passe à une valeur égale à - 3, ce qui correspond à un mouvement global de 8 électrons.

(*) Les notions exposées dans ce chapitre ont été tirées, pour la majeure partie, des ouvrages cités en référence. (30, 47, 68).

(**) Le degré d'oxydation d'un atome est un nombre algébrique qui représente une généralisation, pour les réactions ioniques, de la mesure de la charge électrique mise en jeu dans les transformations effectuées par voie électrochimique. L'oxydation d'un élément correspond à une augmentation de son degré d'oxydation, la réduction à une diminution.

Entre ces limites, un certain nombre de composés intermédiaires ont été impliqués tant dans les mécanismes de réduction physicochimique que biologique.

Nous avons représenté dans le Tableau I, le degré d'oxydation, la formule et la dénomination des principaux intermédiaires qui peuvent être envisagés.

Degré d'oxydation	Formule	Dénomination	Formes hydratées	
			Formule	Dénomination
+ 5	N_2O_5	Anhydride nitrique	HNO_3	Acide nitrique
+ 4	NO_2	Bioxyde d'azote		
	N_2O_4	Tetroxyde d'azote		
+ 3	N_2O_3	Anhydride nitreux	HNO_2	Acide nitreux
+ 2	NO	Oxyde nitrique	H_2NO_2	Acide nitroxylique
+ 1	N_2O	Oxyde nitreux	$N_2N_2O_2$	Acide hyponitreux
	NOH	Nitroxyle		
0	N_2	Azote		
- 1	NH_2OH	Hydroxylamine		
- 2	N_2H_4	Hydrazine		
- 3	NH_3	Ammoniac	NH_4OH	Ammoniaque

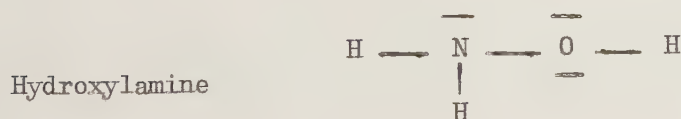
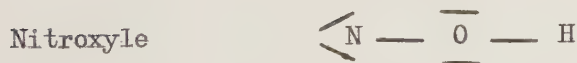
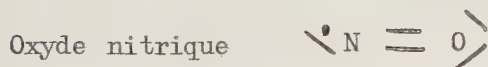
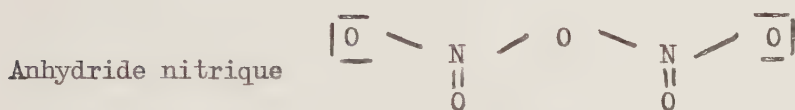
TABLEAU I

I.1.2. - LES STRUCTURES ELECTRONIQUES DES COMPOSES MINÉRAUX DE L'AZOTE

L'azote qui possède un nombre impair d'électrons de valence $|N \equiv N|$ et une covalence normale impaire, forme avec l'oxygène un nombre relativement élevé de composés. Certaines combinaisons ne peuvent être formulées qu'en attribuant à la couche externe de l'atome d'azote une valeur inférieure à la valeur normale de l'octet, avec

possibilité d'électrons libres leur conférant des propriétés paramagnétiques.

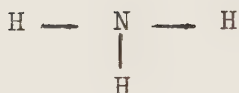
On peut ainsi représenter les structures électroniques de quelques composés oxygénés et hydrogénés de l'azote.



Hydrazine



Ammoniac



Il est bien entendu que ces structures ne représentent, pour la plupart, qu'un état limite de leur possibilité de résonance. C'est ainsi que pour l'oxyde nitreux par exemple, on peut envisager les formules mésomères suivantes :



1.1.3. - PROPRIETES PHYSICOCHEMIIQUES DES NITRATES ET DES NITRITES

Nous nous sommes limités aux propriétés essentielles de ces deux groupes de composés qui ont fait plus particulièrement l'objet de notre travail.

a) Acide nitrique et nitrates

L'acide nitrique se caractérise à la fois par ses propriétés acides et oxydantes. C'est un mono acide fort avec une constante de dissociation K_a égale à 1,2, dont les sels métalliques sont considérés comme stables, et sont pratiquement tous solubles. L'acide nitrique est aussi un oxydant. Il peut être réduit de manière variable suivant les conditions.

En milieu acide, le premier stade est sans doute la réduction en acide nitreux :



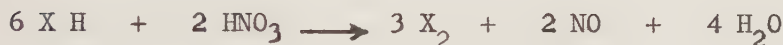
avec un potentiel normal d'oxydo-réduction $E_0 = 0,94$ volt.

Cette réaction est en fait théorique, la réduction de l'ion nitrique dépend du pH.

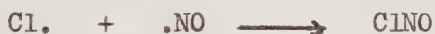
- Pour des concentrations faibles en acide, en raison de la dissociation de l'acide nitreux, la réaction peut s'écrire :



Avec les hydracides on observe la libération de l'halogène :



Dans le cas particulier de l'acide chlorhydrique, l'atome de chlore libéré se fixe sur l'oxyde nitrique pour donner du chlorure de nitrosyle :



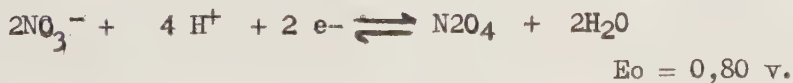
D'où la réaction globale :



En présence d'eau ce chlorure de nitrosyle se décompose facilement en donnant de l'acide nitreux :



- Pour des concentrations élevées en acide, la réaction devient :



Cependant le potentiel de ce dernier couple varie également avec la concentration en ion hydrogène et la réaction n'est pas quantitative. Ainsi l'acide nitrique

concentré est un agent d'oxydation faible dont la vitesse de réaction est lente.

Ces propriétés oxydantes sont intéressantes dans le cas de matières organiques où, en présence d'acide nitrique, il y a formation de dérivés nitrés suivant la réaction :



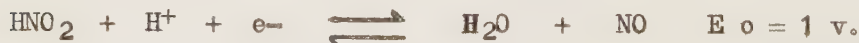
Cette nitration, particulièrement aisée sur les dérivés phénoliques, est utilisée pour caractériser et doser de faibles quantités de nitrates.

b) Acides nitreux et nitrites

Les propriétés essentielles de l'acide nitreux sont également liées à sa fonction acide et à ses propriétés oxydo-réductrices.

C'est un acide faible dont la constante de dissociation est égale à $4 \cdot 10^{-4}$. Composé intermédiaire dans les dérivés oxygénés de l'azote, il peut jouer à la fois le rôle d'un oxydant et d'un réducteur.

On peut admettre le couple d'oxydo réduction suivant :



et la réaction s'arrête à ce stade en raison de l'inertie remarquable de l'oxyde nitrique.

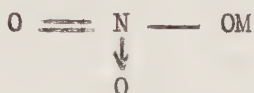
Les ions ferreux - faiblement réducteurs - et les ions titanux puissamment réducteurs - réduisent l'acide nitreux en oxyde nitrique. Ce stade peut cependant être dépassé, il a été montré que les ions stanneux réduisent au moins partiellement l'acide nitreux en hydroxylamine.

Dans les deux premiers cas, il y a mise en oeuvre d'un seul électron ($Me + n \longrightarrow Me^{(n-1)} + e^-$); dans le cas de l'ion stanneux il y a mise en oeuvre de deux

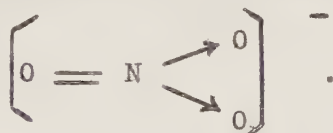
électrons ($\text{Sn}^{2+} \rightarrow \text{Sn}^{4+} + 2e^-$) et l'on doit admettre la formation d'un composé intermédiaire de degré d'oxydation + 1 qui pourrait être l'oxyde nitreux, le nitroxyle ou plus probablement le dihydroxylammoniaque $\text{NH}(\text{OH})_2$.

Ce rappel des propriétés chimiques permet d'envisager la constitution de l'acide nitrique, de l'acide nitreux, et de leurs sels respectifs.

On peut représenter la structure des nitrates par la formule :



et celle de l'ion nitrate par la formule



Par contre, il est difficile de proposer un schéma identique pour l'acide nitrique puisque en solution les nitrates ne possèdent pas les propriétés oxydantes de l'acide. Ce dernier ne renfermerait donc pas l'ion nitrate, mais aucune autre structure, à notre connaissance du moins, n'a été proposée jusqu'à présent.

De même, l'ion nitreux aurait la constitution $(\text{O} = \text{N} \rightarrow \text{O})^-$ correspondant pour l'acide à la formule $\text{O} = \text{N} \rightarrow \text{OH}$. En fait, comme précédemment, le pouvoir oxydant de l'acide nitreux fait défaut aux nitrites en solution neutre et l'on peut penser que l'ion $[\text{NO}_2]^-$ n'existe pas dans l'acide.

CHAPITRE I.2

I.2. - LA REDUCTION DES NITRATES
EN BIOLOGIE

On connaît l'importance des protéines dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle de toute forme biologique. Les acides aminés constitutifs de ces protéines sont le résultat de nombreuses réactions de dégradation, synthèse, ou interconversion métaboliques. Si les organismes supérieurs ont des possibilités limitées dans ce domaine, les microorganismes sont capables de réaliser une synthèse totale à partir de l'azote minéral apporté par le milieu environnant. Les sels ammoniacaux en général et l'ammoniaque en particulier sont les formes utilisables essentielles; cependant les nitrates du sol représentent un apport important d'azote que les végétaux métabolisent et qu'un certain nombre de microorganismes assimilent ou utilisent.

Dans ce cas, le mécanisme de l'assimilation ne peut se faire que par une "désoxygénation" qui englobe selon VERHOEVEN (83) : "Tous les processus par lesquels le nitrate disparaît d'un milieu où l'azote nitrique est retrouvé à un stade moins oxydé".

L'oxygène ne se dégage pas, tout au moins dans les conditions biologiques. Il se fixe sur l'hydrogène provenant de composés organiques définis et il joue le rôle d'accepteur d'hydrogène.

Quelle est la nature des mécanismes mis en jeu ?

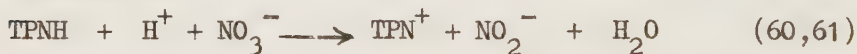
I.2.1. - CHEZ LES VÉGÉTAUX ET LES MICROORGANISMES

1) Les végétaux

D'après les travaux effectués jusqu'en 1939 (LEMOIGNE (49)) on pouvait envisager, soit une réduction chimique de nature catalytique, soit une réduction physique de nature photochimique. En fait toutes les tentatives pour mettre en évidence un système catalytique, n'avaient abouti qu'à des résultats incertains ou décevants. Beaucoup d'auteurs n'envisageaient alors qu'un mécanisme purement photochimique, mais il était difficile d'admettre son rôle exclusif.

Quelques années plus tard les auteurs anglo-saxons reprenant cette étude, mettent en évidence de nombreux faits allant à l'encontre de cette hypothèse et dont nous ne retiendrons que l'essentiel.

L'utilisation des nitrates par les végétaux est assurée par des enzymes molybdoflavoprotéiques (type "nitrate-réductase") qui catalysent le transfert des électrons du TPNH (*) ou du DPNH (*) sur le nitrate suivant la réaction :



Mais le nitrite à son tour peut participer à des réactions cédant de l'énergie : ainsi certaines préparations végétales catalysent la réduction du nitrite par le TPNH en hydroxylamine. Sous l'influence d'une "nitrite-réductase", il se produit un transfert de quatre électrons (le degré d'oxydation de l'hydroxylamine est -1) ; en fait, il s'agirait de deux étapes à deux électrons avec formation transitoire du radical nitroxyl NOH ou de son dimère l'acide hyponitreux, de niveau d'oxydation +1, qui à son tour se décomposerait en oxyde nitreux et en eau.

On a montré en outre, que des préparations enzymatiques de levure (22, 23, 57) (*Neurospora*) catalyseraient la réduction de l'hydroxylamine en ammoniacque sous l'influence du DPNH suivant la réaction :



(*) Abréviations utilisées : DPNH : Diphosphopyridine nucléotide réduit
TPNH : Triphosphopyridine nucléotide réduit

Les deux systèmes enzymatiques "nitrite et hydroxylamine réductases" fonctionnent avec la participation de constituants flaviniques (54, 99).

Tous ces intermédiaires ont pu être identifiés, excepté celui dont l'atome d'azote a le degré d'oxydation +1 : nitroxyle, acide nitroxylrique ou acide hyponitrique. Il a pu être proposé ainsi le schéma suivant qui résume le mécanisme possible de la réduction métabolique des nitrates en ammoniac chez les végétaux supérieurs (*):

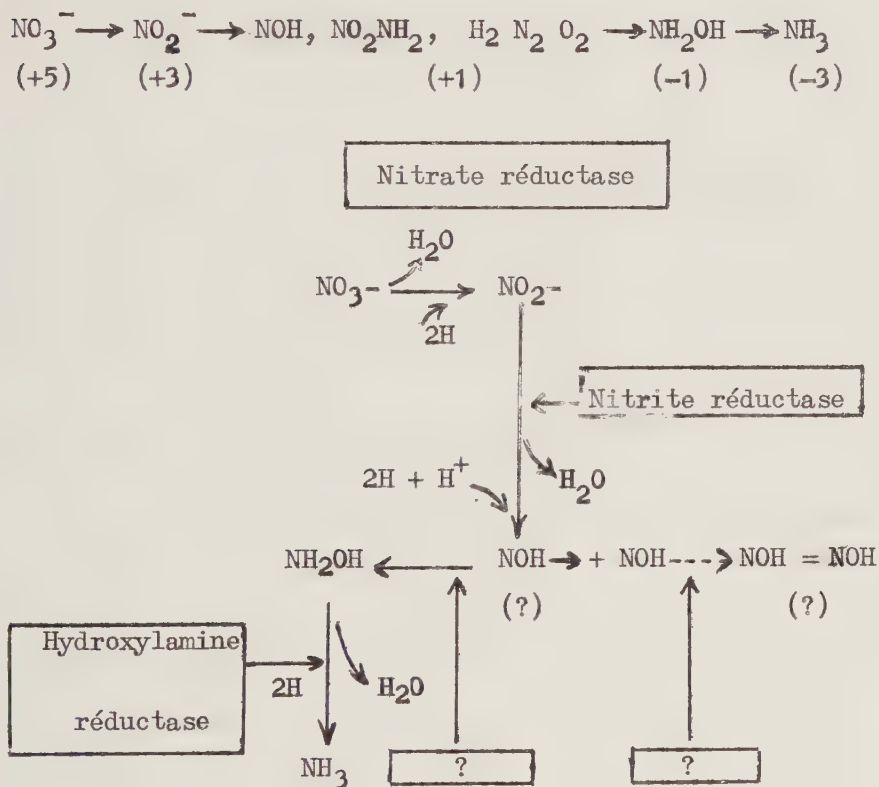


Tableau 1

(*) Il est d'ailleurs possible que certains intermédiaires soient liés à des composés organiques; notamment que l'hydroxylamine soit utilisée sous forme d'oxime qui serait ensuite réduite en dérivé aminé (79).

2) Les microorganismes

A côté de cette réduction qui a pour effet une assimilation de l'azote à l'état de composés aminés, il existe une autre forme de réduction, tout à fait différente dans sa signification, et que l'on observe chez certains microorganismes : il s'agit de la respiration. Ce processus est en relation avec l'apport d'énergie nécessaire aux activités cellulaires en anaérobiose; les nitrates sont utilisés comme accepteurs d'hydrogène dans des réactions énergétiques, les produits de réduction se retrouvant sous la forme d'oxyde nitreux, d'azote, ou ammoniacque. On peut donc penser que ce type de réduction procède d'un mécanisme différent.

RYO-SATO (76) a insisté sur l'importance des systèmes cytochromes jouant précisément le rôle de catalyseur de ces réactions, sans toutefois exclure la participation du DPN et du FAD (*), il a même tenté de classer les différents types de microorganismes réduisant les nitrates suivant l'existence ou non de cytochromes et leur aptitude à fonctionner à l'état réduit ou oxydé.

Ainsi chez les microorganismes la réduction des nitrates aurait deux fonctions majeures liées à l'assimilation et à la respiration (76) : l'assimilation serait attribuée à l'action d'enzymes molybdoflavoprotéiques, la respiration à l'action des cytochromes.

Mais notons toutefois que les deux fonctions peuvent coexister, préférentiellement suivant les conditions; c'est le cas d'*Escherichia coli*, par exemple, qui contient les deux systèmes.

I.2.2. - CHEZ LES ANIMAUX SUPERIEURS

Notre étude portant exclusivement sur l'homme, nous nous sommes limités aux notions intéressant le devenir des nitrates chez les mammifères.

(*)

Abréviation utilisée :

FAD : Flavine adenine dinucléotide.

1) Mise en évidence d'une réduction in vitro

Dès 1899, ABELOUS et ses Collaborateurs (1), découvrent dans le rein de cheval un enzyme thermolabile réduisant le nitrate en nitrite et dont l'action est ralentie par l'oxygène et accélérée par l'hydrogène. Des expériences antérieures réalisées par ces auteurs (2) avaient déjà montré que ce même tissu contient une diastase thermolabile qui peut oxyder l'aldéhyde salicylique en acide correspondant. Quelques années plus tard la diastase oxydante et réductrice est identifiée par ABELOUS et ALOY (3) qui concluent à un seul et même ferment oxydo-réducteur. Ces travaux ont été repris par la suite; poursuivant les travaux de SCHARDINGER (77), BACH (7) découvre dans le foie de veau une diastase susceptible d'oxyder les aldéhydes, l'ion nitrate se comportant comme un accepteur d'hydrogène :



Selon DIXON et THURLOW (20) (1924), l'enzyme responsable de cette oxydo-réduction s'identifierait à la xanthine oxydase, mise en évidence par ces auteurs; elle serait capable d'oxyder l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, les accepteurs d'hydrogène étant soit le bleu de méthylène, soit l'ion nitrate.

En 1928, BERNHEIM et DIXON (9), travaillant sur des homogénéisats de muscles striés de rats et de boeufs, caractérisent, en utilisant l'inhibition éventuelle des ions cyanures deux systèmes enzymatiques capables de réduire les nitrates. Le premier, la xanthine oxydase qui n'est pas inhibée par les cyanures, réduit l'oxygène en peroxyde d'hydrogène, le bleu de méthylène en son leuco-dérivé, le nitrate en nitrite et oxyde les composés puriques en acide urique. L'autre système provoque également la réduction des nitrates en nitrites mais serait inhibé par la présence dans le milieu de cyanure de sodium. Les donateurs d'hydrogène nécessaires à cette oxydo-réduction n'ont pas été identifiés par les auteurs.

Vingt ans plus tard, les progrès de l'enzymologie permettent aux chercheurs japonais de préciser l'activité enzymatique d'une "nitrate-réductase" dans le foie de

plusieurs espèces animales. (64, 65, 66). En étudiant l'activité de certains enzymes type oximase (93) et transoximase (94, 95), YAMAFUGI et ses collaborateurs envisagent la formation d'hydroxylamine dans les cellules vivantes et par là même l'existence possible d'un cycle enzymatique entre le nitrate et l'ammoniaque (96, 97).

Cette hypothèse a été confirmée, partiellement au moins, par l'isolement d'une préparation enzymatique extraite du foie de poule capable de réduire le nitrate, le nitrite, l'hyponitrite, l'hydroxylamine mais ceci en présence de coenzymes tels que le DPNH et le FAD. Inversement, à côté de ces réductases, existent des déshydrogénases intéressant l'ammoniaque, l'hydroxylamine, l'hyponitrite, le nitrite et ne fonctionnant qu'avec le DPN.

Sans qu'on puisse conclure à l'identité de ces processus avec ceux mis en évidence antérieurement au niveau des végétaux et des microorganismes, on peut noter cependant qu'il existe entre eux une analogie étroite. En fonction de ces données récentes, YAMAFUGI admet une formation possible d'acides aminés dans les tissus animaux avec un intermédiaire oximique. Le tableau suivant résume le cycle supposé de l'azote minéral incluant la réaction oximase-transoximase :

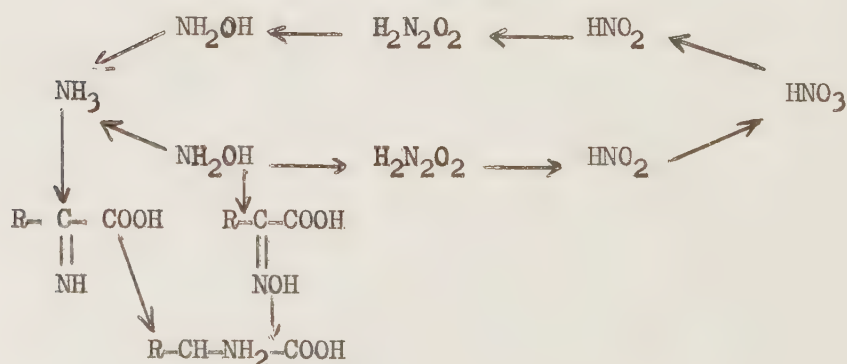


Tableau 2

2) Mise en évidence d'une réduction in vivo

Les premières données chez l'homme remontent aux travaux de KEITH, WHELAN et BANNICK (42). Administré par voie orale à la dose de 10 g., le nitrate d'ammonium est absorbé en totalité et l'élimination urinaire des nitrates représente 88 p. 100 de la dose ingérée, dans les deux à trois jours qui suivent l'administration de ce sel. Par contre WHELAN (88) note chez le chien une excrétion urinaire d'environ 50 p. 100 lorsqu'on introduit par sonde pendant plusieurs jours, 10 ml d'une solution de nitrate d'ammonium à 10 p. 100. En tenant pour négligeable le taux éliminé par les fèces (42), il émet l'hypothèse d'une rétention par les tissus et d'une destruction ultérieure possible. Une confirmation est en partie donnée par l'analyse des tissus; les taux de nitrates trouvés sont nettement plus élevés chez les chiens ayant absorbé des nitrates que chez les témoins. Un travail récent de GREEN et HIATT (32) sur le mécanisme d'excrétion des électrolytes aboutit à des conclusions voisines. Lorsque de petites doses de nitrate de sodium (0,5 meq/kg) sont administrées oralement ou par voie intra-veineuse, le pourcentage éliminé par l'urine varie de 27 à 31 p. 100 dans les quarante huit heures suivantes; ce pourcentage augmente notablement pour atteindre 90 p. 100 avec des quantités de l'ordre de 10 à 14 meq/kg de poids.

Cependant, si les expériences précédentes mettent en évidence la possibilité d'une rétention dans les tissus, condition la plus favorable à une réduction ultérieure des nitrates, un fait nouveau est apparu avec les travaux de STIEGLITZ (80) et de RATH (71).

Disposant d'une méthode de dosage suffisamment sensible, ces auteurs détectent une quantité faible, mais remarquablement constante, de nitrites dans le sang humain, et envisagent comme source possible de ces nitrites leur formation au niveau du tractus intestinal ou au niveau des tissus (6) (89), sans doute par réduction des nitrates d'origine alimentaire.

Pour certains (71) cette réduction tissulaire résulterait de l'action d'un système d'oxydo-réduction hépatique (9, 20) : il y aurait production et destruction

simultanée du nitrite, dont les effets se manifesteraient, même à l'état de traces, sur les muscles lisses et sur la tension artérielle.

L'aptitude des tissus vivants à réduire les nitrates in vitro et in vivo, outre l'activité thérapeutique pouvant en résulter, nous amène à envisager les conséquences toxiques possibles. L'action vasculaire du nitrite de sodium s'exerce déjà à de très faibles doses bien avant d'atteindre le seuil de toxicité de ce sel. Une action toxique n'est pas à exclure cependant si à la suite d'un apport massif de nitrates il y avait transformation en nitrites sinon intégralement, du moins dans des proportions importantes.

Un des exemples les plus classiques d'une telle réaction tissulaire, est la formation des nitrites à partir des nitrates ajoutés à la viande comme conservateurs. On sait, en effet, depuis ORLOW (67) que ce sont les nitrites apparus qui assurent la conservation de la viande de charcuterie, tout en lui donnant une coloration rosée, recherchée, paraît-il, par les consommateurs. Ainsi on emploie volontiers des saumures contenant à la fois du chlorure de sodium, du nitrate et du saccharose, Ce dernier servant à masquer la saveur salée.

D'après MAZE (53), la réduction microbienne des nitrates en nitrites serait liée à une fermentation lactique aux dépens des glucides.

Si la quantité des nitrites ainsi apparus ne dépasse que rarement les doses utilisées en thérapeutique quelques accidents toxiques ont cependant été signalés (15). Un processus réductionnel analogue prenant place in vivo, peut occasionner certains troubles. Ainsi ces dernières années, diverses intoxications de ruminants provoquées par des fourrages riches en nitrates ont été décrites. Les travaux de LEWIS, in vivo (50), puis in vitro (51) sur l'intestin isolé de mouton, ont montré l'importance de la flore microbienne. La réduction des nitrates en ammoniacque passe par l'intermédiaire de l'ion nitrite qui, à la suite de son assimilation, peut présenter une certaine toxicité.

Par la suite, chez divers animaux (chèvre, rat, lapin) recevant une nourriture enrichie en nitrate, KAMEOKA

et KILGORE (40) confirment la formation de méthémoglobine; l'élimination de nitrites est semble-t-il proportionnelle aux doses ingérées.

Chez l'homme toutefois, l'apparition de nitrite et de méthémoglobine, ne s'est manifestée qu'exceptionnellement dans quelques cas pathologiques et dans certaines conditions particulières.

C'est ce que l'on a observé après des surcharges importantes en nitrate d'ammonium au cours d'obstruction chronique ou de dysfonctionnement intestinal avec constipation marquée (21). Il est vraisemblable que la stase intestinale accidentelle a favorisé l'action sur l'ion nitrate de la flore microbienne avec secondairement apparition de nitrites. On peut rapprocher ces faits de ceux que l'on a pu observer après ingestion des sous-nitrates de bismuth, dont l'usage est parfois limité pour cette raison. Dans un ordre d'idées voisin, ANDRE (4) note, avec d'autres auteurs (37, 45, 78), la production de nitrites dans les urines au cours de certaines infections urinaires ou maladies fébriles. Dans le premier cas le nitrite est formé localement au niveau rénal sous l'influence de bacilles réducteurs (colibacilles); dans le second, le nitrite est éliminé par voie rénale et sa présence dans les urines ne fait que traduire l'existence d'agents pathogènes réducteurs à l'intérieur des tissus. (Salmonelles, hématozoaires).

Si les intoxications que nous venons de rappeler relèvent le plus souvent de la pathologie, une action toxique des eaux nitratées a été signalée en pédiatrie.

En effet, depuis quelques années, on décrit périodiquement des cas de cyanose isolée, s'accompagnant parfois de mort, chez des nourrissons allaités artificiellement. L'étiologie en demeura longtemps inconnue jusqu'au jour où COMBY et FERRAND (17, 28) attirèrent l'attention sur certaines méthémoglobinémies du nourrisson consécutives à l'administration de biberons coupés d'eau de puits riche en nitrates.

Depuis, la littérature s'est enrichie de nombreuses observations analogues (72, 84) (18, 14) (43). Une étude systématique (13) a montré que ces effets toxiques se

manifesteraient préférentiellement chez le nourrisson de moins de deux mois dont le pH gastrique supérieur à 4 permet la croissance de bactéries utilisant les nitrates. Inversement à des pH inférieurs à 4, il y a inhibition de la prolifération microbienne comme on peut le constater chez le nourrisson plus âgé dont le pH gastrique tend à diminuer pour atteindre rapidement des valeurs de 1,5 à 2.

On explique ainsi les cas isolés de méthémoglobinémies dans une collectivité d'enfants ingérant la même eau, les différents facteurs ou conditions requises pouvant se résumer de la façon suivante :

- Ingestion d'une quantité de nitrate importante par rapport au poids.
- Présence d'une flore microbienne particulière.
- Acidité gastrique en rapport avec l'âge du sujet et permettant la pullulation de germes gastro-intestinaux ou exogènes.
- Qualité de l'hémoglobine (l'hémoglobine foetale étant plus sensible aux agents méthémoglobinisants et représentant 85 p. 100 de l'hémoglobine du nourrisson pendant les quatre premiers mois).

§

Les travaux dont nous venons de rappeler l'essentiel semblent démontrer que les animaux supérieurs sont comme les microorganismes capables de réduire les nitrates dans certaines conditions.

Sans doute une telle réaction est-elle normalement d'une portée bien limitée et à notre connaissance, il n'a jamais été encore mis en évidence chez l'homme adulte une corrélation entre les taux de nitrites sanguins et l'apport des nitrates. Il n'est pas exclu toutefois que ces derniers ne soient responsables de phénomènes toxiques.

Une telle éventualité, récemment prouvée, chez les nourrissons, a été envisagée également chez l'adulte lors de l'emploi de composés nitrates insolubles.

Ces faits nous ont amené à reprendre l'étude du métabolisme des nitrates alcalins chez l'homme adulte présumé sain en nous attachant plus précisément à la recherche d'une corrélation éventuelle entre les taux de nitrates administrés et de nitrites formés en fonction du temps.

CHAPITRE I.3

I.3 - TECHNIQUES DE DOSAGE

DES NITRATES

L'abondance des méthodes et le nombre élevé de techniques proposées, témoignent en fait des difficultés qu'il y a à doser quelques microgrammes de nitrates dans des milieux aussi complexes que le sang et l'urine : un tel dosage implique la mise en oeuvre d'une technique à la fois sensible, précise et spécifique, qualités le plus souvent inconciliables et qui ont limité notre choix.

Les techniques colorimétriques s'avèrent les seules applicables, elles sont cependant d'un emploi délicat car divers composés, toujours présents à côté des nitrates, peuvent gêner le développement des colorations.

Il ne nous a pas paru dénué d'intérêt de rappeler brièvement dans leur principe, celles qui sont le plus couramment utilisées en particulier pour l'évaluation quantitative de l'ion nitrate dans les eaux et les extraits végétaux.

On peut les classer en trois groupes principaux : les méthodes de nitration, les méthodes d'oxydo-réduction, les méthodes de réduction.

L'étude de chaque groupe nous permettra de dégager, en fonction des impératifs déjà énoncés, les possibilités éventuelles d'application aux milieux biologiques.

I.3.1. - METHODES BASEES SUR DES REACTIONS DE NITRATION (*)

I.3.1.1. - Nitration du benzène (69), (70).

En milieu sulfurique concentré et à chaud, l'acide nitrique transforme le benzène en méta-dinitro benzène qui, condensé avec l'acétone en présence d'hydroxyde de sodium, développe une coloration violet intense.

On peut aussi partir du nitrobenzène, le transformer en métadinitro-dérivé à froid et terminer comme précédemment. Cette dernière technique serait assez spécifique mais elle est cependant gênée par la présence d'ions chlorures.

I.3.1.2. - Nitration de l'acide phénol 2,4-disulfonique (38) (82) avec formation d'un composé nitré jaune, l'acide 6-nitro I-phényl 2,4-disulfonique.

C'est la méthode de routine pour la détermination des nitrates dans les eaux et les extraits végétaux, mais elle nécessite l'élimination des chlorures et la destruction de toute matière organique oxydable. D'autre part, tout récemment, on a signalé une autre interférence sensible, celle des ions ammoniums (36).

I.3.1.3. - Nitration du 2,4-xylénol (8) et du 3,4-xylénol (35), (39).

L'acide nitrique libéré de ses combinaisons salines par action de l'acide sulfurique à 80 p. 100 peut nitrer soit le 2,4 soit le 3,4-xylénol pour former un dérivé nitré en position 6.

Le 6 nitro 2,4-xylénol est extrait par le toluène, le 6 nitro 3,4-xylénol est entraîné par la vapeur d'eau; tous deux sont traités par une solution d'hydroxyde de sodium pour former un sel de sodium fortement coloré aisément dosable par colorimétrie.

(*) Dans cette série nous nous sommes limités aux plus classiques ou à celles qui ont fait l'objet d'un développement récent.

I.3.1.4. - Nitration de l'acide chromatropique ou acide 4,5-dihydroxy 2,7-naphtalène disulfonique(63) (86) ou du sel de sodium de ce même acide(87) en milieu sulfurique concentré.

Ces deux réactifs sont assez sensibles à de nombreuses interférences, en particulier à celles des ions chlorures et des ions ferriques et sont particulièrement instables à la lumière.

§

On peut citer encore l'action de l'ion nitrate sur le sulfate ferreux, en milieu sulfurique; le complexe brun pourpre obtenu est dosable par colorimétrie. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une réaction de nitration, mais plutôt d'un composé d'addition entre l'oxyde nitrique et le sel ferreux de formule $\left[\text{Fe (No) SO}_4 \right]$ (81, 26).

I.3.2. - METHODES BASEES SUR DES REACTIONS D'OXYDO-REDUCTION EN MILIEU SULFURIQUE CONCENTRE AVEC

- la diphenyl amine (90), (74)
- la diphenyl benzidine (25), (74)
- le diphenyl sulfonate de sodium (12).

Ces réactions sont très sensibles mais les colorations sont peu spécifiques (les nitrites interfèrent), instables et varient suivant les quantités de réactifs et d'ions nitrates mises en jeu.

De plus, elles ne suivent pas la loi de Beer-Lambert et se prêtent mal à une évaluation quantitative. On peut rattacher aussi à ce groupe l'action de l'ion nitrate sur la brucine (55), (29) ou sur quelques dérivés de la strychnine (85) en milieu sulfurique concentré. En faisant varier la concentration en acide sulfurique, il est possible de doser à l'aide de cette technique, les nitrites et les nitrates séparément ou en mélange. L'intensité

des colorations dépend en effet des taux de nitrates et de nitrites, de la concentration en acide sulfurique, de l'ordre d'addition de cet acide ou du réactif et de la température atteinte par la solution. Cependant, en se plaçant dans des conditions opératoires strictes et toujours identiques, l'intensité des colorations varie quelque peu et les auteurs préconisent, à chaque essai, la vérification de deux ou trois points de la courbe étalon.

§

En pratique et pour résumer, les méthodes de nitration sont plus longues à mettre en oeuvre que les méthodes d'oxydo-réduction; les premières sont relativement plus spécifiques mais moins sensibles que les secondes (exception faite peut-être pour la méthode à la brucine). Toutes, enfin, en raison des interférences possibles d'ions ou de composés organiques habituellement présents dans un milieu biologique sont d'une utilisation délicate en biologie. L'ion chlorure notamment, réagit avec l'ion nitrate en milieu sulfurique concentré pour former un chlorure de nitrosyle volatil :



Les nitrates subissent aussi, en présence de matière organique et d'acide sulfurique, une réduction partielle en acide nitreux.

I.3.3. - METHODES DE REDUCTION

I.3.3.1. - Réduction des nitrates

a) en ammoniacque par l'alliage de DEWARDA (5)

C'est une méthode classique qu'il est possible d'appliquer à la microdiffusion, mais dans le cas de milieux biologiques l'azote nitrique ne peut être évalué que par différence.

b) en dérivé aminé puis en sel ammoniacal par une technique de Kjeldalh (19) modifiée comprenant :

- une transformation des nitrates en acide nitro-salicylique en présence d'acide sulfurique concentré et d'acide salicylique,
- un traitement du composé nitré par la poudre de zinc pour réduire le groupement aminé,
- une attaque prolongée du composé aminé avec de l'acide sulfurique pour convertir le groupement aminé en sulfate d'ammonium. Mais la méthode est difficile à mettre en oeuvre en présence de sels ammoniacaux et d'urée car elle nécessite une estimation préalable de l'azote total, puis une réduction et un nouveau dosage et l'azote nitrique n'est obtenu ici encore que par différence.

I.3.3.2. - Réduction des nitrates en nitrites

La possibilité de réduire les nitrates en nitrites est intéressante car le dosage ainsi obtenu peut être réalisé par diazotation et copulation; la réaction est extrêmement sensible et spécifique. Rappelons-en le principe : la solution acidifiée d'un nitrite est traitée par un mélange d'une amine aromatique et d'un corps possédant un : groupement phénolique ou aminé. Dans la diazotation, découverte par GRIESS en 1866, l'acide nitreux mis en liberté en milieu acide donne avec l'amine un dérivé diazoïque de formule :
$$\text{A R-N} \begin{array}{c} \text{=} \text{N} \\ | \\ \text{X} \end{array}$$

Le sel de diazonium peut fixer une molécule d'amine ou de phénol pour engendrer, par copulation, un composé instable qui se transforme instantanément en un produit coloré.

Parmi les différents modes de réduction, on peut distinguer :

- 1) Une réduction enzymatique à l'aide, soit d'enzyme purifié, type nitrate réductase (31), (58,62), soit de souches sélectionnées de germes isolés du sol (41)

ou de l'intestin de mouton (30). Toutes les méthodes basées sur ce mode de réduction seraient spécifiques mais elles sont longues, et, outre la difficulté à préparer ou à se procurer telle souche ou extrait purifié, elles nécessitent un étalonnage à chaque série de dosage.

- 2) Une réduction chimique : le réducteur commun employé dans les différentes techniques est le zinc en poudre, que ce soit en milieu acide (59) (92) ou en milieu alcalin (56) (46).

C'est ce type de technique que nous avons plus particulièrement étudié en vue d'une application biologique, pour la facilité, la rapidité de mise en oeuvre, la sensibilité et la spécificité.

Nos observations et nos résultats font l'objet du premier chapitre de la seconde partie de ce travail.

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE II.1

II.1. - TECHNIQUES UTILISEES

II.1.1. - DOSAGE DES NITRATES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES - METHODE PROPOSEE

Nous nous sommes adressés aux méthodes de réduction des nitrates en nitrites et parmi elles celles qui utilisent un réducteur chimique, le zinc à l'état métallique pulvérulent. Parmi les techniques déjà proposées pour la détermination des nitrates dans les eaux et que nous avons choisies, on peut distinguer deux sortes de réactions, celles qui s'effectuent en milieu alcalin et celles qui s'effectuent en milieu acide. Le problème essentiel demeure la réduction. La réduction en milieu alcalin, à pH 10,5 (méthode de MIDDLETON (56) conduirait selon les auteurs à une réduction totale. Cependant des essais en solution pure nous ont constamment donné des liquides colorés opalescents dont le trouble allait croissant avec le temps ; l'évaluation quantitative par colorimétrie devient de ce fait hasardeuse.

En milieu acide, la méthode de WOODWARD (92) et la méthode de NELSON (59) ne se différencient essentiellement que par le pH de la réduction (pH 4-5 et pH 2).

Les résultats obtenus avec la première se sont avérés inconstants et difficilement reproductibles malgré de nombreux essais. Dans la seconde, les différents réactifs servant à acidifier, diazoter et copuler sont sous forme de poudre associée à une suspension où le sulfate de baryum joue le rôle de support inerte. Reprenant les sug-

gestions de RIEDER et MELLON (73), NELSON annonce à pH 2 un maximum de réduction, de stabilité et de rapidité. Pourtant en nous plaçant dans les conditions requises de pH et de concentrations, il nous a été impossible d'obtenir des résultats satisfaisants : les colorations obtenues, même en solution pure ont toujours été extrêmement faibles et variables d'un essai à l'autre. Ces résultats décevants nous ont amené à modifier la technique proposée pour l'adapter au dosage de traces de nitrates dans les milieux biologiques.

Différents réactifs ont été utilisés à la place du réactif unique préconisé; certains facteurs susceptibles d'influencer la réduction (pH, agitation avec la poudre de zinc) ou d'interférer dans la réaction (urée et autres produits biologiques) ont été étudiés de façon systématique et c'est après de nombreux essais que nous avons été amenés à proposer la technique décrite ci-dessous.

Principe :

La réduction catalysée par un sel manganeux, s'effectue en milieu acide (pH = 1) avec de la poudre de zinc, en présence des réactifs de diazotation (acide sulfanilique) et de copulation (α - naphthylamine). La coloration de l'azoïque formé est proportionnelle dans les conditions expérimentales à la teneur en ions nitrates de la prise d'essai pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,8 μ eq (2 à 10 μ g d'azote). (75).

Réactifs :

Toutes les solutions doivent être faites avec de l'eau distillée fraîchement préparée et à l'aide de produits purs (*).

- R (I) : solution étalon de nitrate de sodium à 0,01 Eq par litre (soit 0,850 g/l). A conserver au réfrigérateur.
- R (II) : solution d'acide acétique à 20 p.100 en volume.

(*) Prolabo. RP

- R (III) : solution d'acide trichloracétique à 20 p.100 en poids.
- R (IV) : solution de sulfate manganeux à 1 p.100 dans l'acide acétique à 5 p.100.
- R (V) : poudre de zinc pure lavée.

Porter 10 g environ de zinc pur en poudre grossière au bain-marie bouillant en présence de 100 ml d'acide acétique dilué au dixième. Laisser en contact 15 mn. Après refroidissement, filtrer sur verre fritté, laver à nouveau avec la solution acétique, puis abondamment à l'eau distillée et dessécher à l'étude à 100° (27). Recueillir la fraction qui a passé au tamis module 22.

- R (VI) : réactif de GRIESS-ILOSVAY

- . réactif A : dissoudre 0,50 g d'acide sulfanilique dans 150 ml d'acide acétique dilué au dixième.

- . réactif B : dissoudre 0,10 g d'~~naphty~~-
lamine dans 150 ml d'acide acétique dilué au dixième.

(ces deux réactifs doivent se conserver à l'obscurité).

- R (VII) : solution de sulfate de zinc à 10 p.100.
- R (VIII) : solution de soude 0,5 N.

Mode opératoire :

Le sang total ou le plasma sont déféqués par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (R III).

Le filtrat correspond donc à une dilution au demi

du sang ou du plasma. Les urines sont déféquées à l'hydrate de zinc qui assure convenablement leur clarification: à 1 ml d'urine, ajouter successivement 7 ml d'eau distillée et 1 ml des réactifs (R VII) et (R VIII).

Agiter, filtrer; 1 ml de filtrat correspond à 0,1 ml d'urine (*).

La prise d'essai déféquée et éventuellement diluée à 4 ml est introduite dans un erlenmeyer bouché émeri de 50 ml, additionné de 1 ml d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (R III), 1 ml de sulfate manganeux (R IV) et de 2 ml de réactifs A et B de Griess.

Boucher l'erlenmeyer, agiter, et laisser en contact 3 minutes; il ne doit se développer aucune coloration décelant la présence de nitrites.

Ajouter alors 50 mg de poudre de zinc (R V). Agiter énergiquement à l'agitateur pendant 1 minute et centrifuger 5 minutes à 4000 tours/mn. La coloration se développe avec le temps; elle est maximale 15 minutes après l'addition de poudre de zinc et stable pendant au moins 1 heure.

Etalonnage :

Il est réalisé à partir de la solution mère de nitrate (R I) diluée au Cinquantième ($0,2 \mu\text{eq/ml}$). Les prises d'essais de 0 à 4 ml sont toutes complétées par de l'eau distillée à 4 ml et les dosages s'effectuent comme il a été décrit plus haut (**). Les mesures colorimétriques (écran vert, $\lambda_m = 530 \text{ m}\mu$) permettent de construire une courbe étalon qui est une droite passant par l'origine pour des concentrations comprises entre $0,1$ et $0,8 \mu\text{eq}$ dans la prise d'essai (soit 2 à $10 \mu\text{g}$ d'azote).

(*) Ce mode de défécation est également applicable au sang total, au plasma et autres liquides biologiques, notamment à la salive.

(**) La vérification de quelques points de la courbe étalon n'est pas nécessaire lorsqu'on emploie des réactifs A et B de Griess fraîchement préparés. Par contre il est recommandé de procéder à un contrôle de l'étalonnage à chaque utilisation d'une nouvelle poudre de zinc traitée de la manière indiquée.

Il est possible d'augmenter la sensibilité par extraction butanolique de l'azoïque coloré; une fois la coloration stabilisée, ajouter au milieu réactionnel environ 2 g. de chlorure de sodium et 5 ml de butanol normal. Agiter, l'azoïque passe en totalité **dans la phase organique**. On peut reprendre soit la totalité de la coloration finale, soit seulement une partie aliquote. L'extraction est satisfaisante et les pertes occasionnées sont minimales. Un **substrat** initialement très coloré (certaines urines) peut aussi justifier l'emploi de ce mode opératoire.

II.1.1.1. - Facteurs influençants ou susceptibles d'interférer dans la réaction

La diazotation des nitrites par le réactif de Griess est trop classique pour que nous en fassions la critique et les quantités de réactifs A et B sont très largement excédentaires pour pallier à leur destruction éventuelle au cours de la réduction. Il est par contre nécessaire de préciser les conditions dans lesquelles se fait la réduction des nitrates en nitrites et d'étudier quelques interférences possibles dans le cas des milieux biologiques.

II.1.1.1.1. - Facteurs susceptibles de modifier la réduction

1) Temps de réduction : trente secondes d'agitation, lors de la réduction, sont suffisantes pour obtenir une coloration qui atteint son maximum 10 minutes après; nous avons adopté une durée de 1 minute. Une action plus prolongée du zinc est à éviter : elle abaisse l'intensité de la coloration finale, sans doute en raison de réactions réductrices secondaires. On séparera le zinc du milieu réactionnel par décantation suivie de centrifugation (la filtration est déconseillée, le papier filtre pouvant adsorber une partie de la coloration et occasionner des pertes sensibles).

2) pH : NELSON (59) préconise l'emploi d'acide acétique à 20 p.100 et admet que le pH doit être compris en-

tre 2 et 3. Une étude systématique nous a permis d'observer que si la coloration apparaît plus rapide en présence d'acide acétique, elle est finalement beaucoup moins intense qu'en milieu trichloracétique. Avec cet acide l'intensité de la coloration est maximale dans les conditions que nous avons précisées et qui correspondent à un pH de 1,0. La quantité d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (R III) que nous avons adoptée est de 1 ml pour un volume réactionnel de 10 ml. En augmentant ces concentrations de 1 à 3 ml pour une même quantité d'ions nitrates sous un volume de 10 ml, on diminue de près de 70 p.100 la densité optique finale.

II.1.1.1.2. - Facteurs susceptibles d'interférer dans la réduction

1) Influence des nitrites

Si les ions nitreux préexistent, leur présence est décelée dans le premier temps du dosage, avant l'addition de la poudre de zinc. Il n'est pas possible d'en tenir compte dans la mesure colorimétrique car la réduction des nitrates par l'hydrogène s'accompagne, au moins de façon partielle, de celle de l'azoïque préformé en hydrazoïque incolore. Leur élimination s'impose donc et elle peut être réalisée de deux façons :

a) l'azoture de sodium décompose l'acide nitreux en oxyde nitreux, azote et eau suivant la réaction :



Cette décomposition s'effectue en milieu très légèrement acide et l'on opère ainsi : la prise d'essai, éventuellement neutralisée (*) est additionnée d'une goutte d'acide acétique à 20 p.100 (R II) et d'une goutte d'azoture de sodium à 0,1 p.100. Agiter. La réaction est instantanée. L'azoture en excès est ensuite décomposé par maintien de la solution au bain-marie bouillant

(*) En présence de nitrites, il peut y avoir intérêt à remplacer la défécation trichloracétique par une défécation à l'hydrate de zinc qui donne un filtat sensiblement neutre.

pendant 10 minutes. La destruction est ainsi totale, ce qui est indispensable pour éviter l'altération ultérieure des nitrites formés par réduction des nitrates. (48)

b) le chlorure d'ammonium décompose le nitrite conformément à l'équation :



Il se fait comme produit intermédiaire du nitrite d'ammonium instable qui se décompose en azote et en eau :



La chaleur est nécessaire pour amorcer la réaction qui devient très vive si la solution de nitrite est concentrée.

On utilise une solution de chlorure d'ammonium 4 N à parties égales avec la solution neutre, et l'on porte au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. (10)

La perte en nitrate est tout à fait négligeable et le chlorure d'ammonium en excès n'interfère pas dans le test ultérieur puisque la réaction est exécutée à froid.

2) Influence de l'urée

Quelle que soit sa concentration dans le milieu, l'urée n'exerce aucune influence sur le développement de la coloration. Des courbes étalons menées parallèlement en milieu acétique et trichloracétique et en présence d'urée se sont avérées comparables à celles des témoins. Un tel résultat s'explique aisément : contrairement à la réaction de l'urée sur l'acide nitreux formé en cours de réduction, la diazotation est immédiate et le sel de diazonium formé est stable en présence d'urée.

3) Influence des substances aminées

Les acides aminés et les amines biologiques, en quantité normalement très faibles, n'interfèrent pratiquement pas.

Parmi eux, l'indole, l'acide β -indolacétique, l'hydroxyproline, la proline, le tryptophane, l'histamine, la tyrosine ont été testés qualitativement puis rajoutés en excès à une solution pure et à un échantillon d'urines dosés en nitrates. Seul l'indol substitué au réactif A de Griess a donné une faible coloration rose avec le réactif B. Il pourrait ne pas en être de même pour certains médicaments possédant un ou plusieurs groupements aminés primaires juxta-nucléaires (sulfamides, acide para-aminosalicylique). En fait ces dérivés, comme certains acides aminés ou amines, sont susceptibles de se substituer dans la réaction soit à l'acide sulfanilique, soit à l' α -naphtylamine, mais de nombreux essais comparatifs nous ont montré que leur présence n'apporte pas aux résultats de modifications sensibles.

4) Influence de la bilirubine

On sait que la bilirubine peut se copuler avec le sel de diazonium de l'acide sulfanilique et qu'elle communique à l'urine une coloration brune qui interdit tout dosage photométrique.

La défécation trichloracétique et hydrozincique du sang total ou du plasma élimine totalement les pigments adsorbés dans le précipité protéique. Dans les urines fortement colorées, il y a parfois intérêt à ajouter à la prise d'essai une solution d'albumine (éventuellement du sérum) pour précipiter quantitativement les pigments au cours de la défécation.

5) Influence des chlorures, phosphates, urates, glucose

La possibilité d'interférence pour ces substances normalement ou anormalement présentes dans les urines a été étudiée.

Aucune modification sensible dans les résultats n'a été notée lorsque ces corps existent à différentes concentrations, simultanément ou isolément.

II.1.1.2. - Applications

1) Sang

Nous ne donnerons pas ici tous les résultats expérimentaux qui nous ont permis d'éliminer les possibilités d'interférences des composés cités plus haut, mais nous avons vérifié la validité de notre technique par la méthode des quantités ajoutées sur une série d'échantillons de sang total et de plasma fluoré, citraté, hépariné.

La nature des anticoagulants ne semble pas interférer sur les résultats qui dans tous les étalonnages réalisés ont été reproductibles aux erreurs de manipulation près. D'autre part une étude statistique portant sur une même concentration de nitrate ($5 \mu\text{g}$ d'azote nitrique dans la prise d'essai) a été conduite sur 25 échantillons de sang prélevé sur citrate de sodium : La précision est toujours voisine de 5 p.100, de l'ordre de celle admise par les auteurs pour le dosage des nitrates dans le sol et les extraits végétaux. (Voir Tableau page 44).

2) Urines

L'apport des nitrates est uniquement dévolu à l'alimentation et l'importance de leur élimination dépend du régime. Les taux trouvés varient dans de très larges limites (voir plus loin) et ces variations nécessitent d'effectuer le dosage sur deux ou trois dilutions de l'urine déféquée. Mais pratiquement une dilution au dixième est utilisable dans la majorité des cas; elle permet de couvrir des taux de 10 à 100 mg exprimés en azote par litre (0,7 à 7 meq).

3) Autres liquides biologiques

La technique proposée est également applicable à la salive, au lait et au liquide céphalo-rachidien. Dans ce dernier cas, elle peut avantageusement remplacer la méthode à la diphenyl amine dans les épreuves de perméabilité méningée aux nitrates (52). On utilisera une défécation hydrozincique de préférence à une défécation trichloracétique qui donne en présence de faibles quantités de protéines, une suspension colloïdale impossible à détruire par centrifugation.

Numéro des échantillons	Densité optique trouvée	Densité optique des témoins	Densité optique réelle D.O. trouvée D.O. des témoins	Taux en μ g d'azote nitrique par ml
1	0,31	0,05	0,26	4,9
2	0,30	0,03	0,27	5,1
3	0,315	0,055	0,26	4,9
4	0,305	0,055	0,25	4,75
5	0,30	0,04	0,26	4,9
6	0,31	0,05	0,26	4,9
7	0,315	0,04	0,275	5,2
8	0,32	0,06	0,26	4,9
9	0,305	0,035	0,27	5,1
10	0,32	0,05	0,27	5,1
11	0,305	0,04	0,265	5
12	0,32	0,055	0,265	5
13	0,305	0,045	0,26	4,9
14	0,31	0,05	0,26	4,9
15	0,305	0,04	0,265	5
16	0,31	0,045	0,265	5
17	0,415	0,145	0,27	5,1
18	0,315	0,05	0,265	5
19	0,30	0,04	0,26	4,9
20	0,295	0,035	0,265	5
21	0,32	0,05	0,27	5,1
22	0,315	0,045	0,27	5,1
23	0,33	0,07	0,26	4,9
24	0,305	0,04	0,265	5
25	0,325	0,065	0,265	5

- TABLEAU I -

Moyenne arithmétique : $\bar{X} = \frac{1}{N} \sum S(x) = 4,98$

Dispersion S^2 d'après la formule :

$$\frac{1}{N-1} (\sum S(x^2) - \bar{X} \sum S(x)) = 0,031$$

Ecart standard $S = \sqrt{S^2} = 0,175$

Intervalle normal : $\bar{X} \pm 2 S = 4,98 \pm 0,35$

Erreur en p.100 : $\frac{0,35 \times 100}{4,98} = 7$

II.1.2. - DOSAGE DES NITRITES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Nous avons utilisé la technique classique de diazotation et de copulation en l'adaptant aux différents milieux biologiques étudiés.

II.1.2.1. - Dans l'urine et la salive

Dans l'urine et la salive, les nitrites sont décelés dans le premier temps de la technique précédemment décrite. On peut augmenter la sensibilité de la colorimétrie en opérant sous le volume final de 4 ml, soit une prise d'essai, défectuée au dixième, de 2 ml, et 1 ml, des réactifs A et B de Griess.

Dans ces conditions, après dix minutes de repos, il est possible d'évaluer des teneurs en nitrites dans la prise d'essai comprise entre $7 \cdot 10^{-3}$ et $7 \cdot 10^{-2} \mu\text{eq}$. (0,1 à $1 \mu\text{g}$ d'azote). L'étalonnage est réalisé par dilution convenable d'une solution de nitrite de potassium à 0,7 meq/l (soit 60 mg/l) conservée au réfrigérateur

II.1.2.2. - Dans le sang

a) Dosage direct par diazotation et copulation :

La détection de faibles traces de nitrites est délicate du fait de la rapidité de leur disparition. STIEGLITZ et PALMER en 1937 (80) ont proposé un mode opératoire presque analogue à celui qui a été décrit pour l'urine. Par la suite RATH et KRANTZ (71) ont apporté quelques modifications, notamment en employant la naphtylamine au lieu du sel disodique de l'acide naphtyl 2-amino 6,8-disulfonique préconisé par les auteurs précédents. La sensibilité serait de $0,2 \mu\text{eq/l}$ et la teneur normale en nitrites dans le sang humain se situerait autour de $2,3 \mu\text{eq/l}$. C'est cette dernière technique que nous avons adaptée à la détermination de la nitritémie en opérant de la façon suivante :

Recueillir à la ponction 8 ml de sang directement sur 8 ml de sulfate de zinc à 10 p.100. Mélanger. On évite ainsi, par un mécanisme qui n'est pas expliqué par les auteurs, la disparition du nitrite qui se produit toujours rapidement. Ajouter 8 ml d'eau distillée et 8 ml de soude 0,5 N. Agiter vigoureusement. Centrifuger dix minutes à 5000 tours minute. Prélever le maximum de filtrat (en général 16 à 20 ml). Ajouter 1 ml de réactif A et B de Griess. Laisser se développer la coloration dix minutes.

Une fois stabilisée, cette coloration s'avère extrêmement faible et difficilement photométrable. On peut augmenter la sensibilité par extraction butanolique en ajoutant 5 ml de butanol normal et 3 à 4 g. de chlorure de sodium. Agiter. L'azoïque passe en totalité dans la phase organique. Décanter et colorimétrer.

Même dans ces conditions, nous n'avons jamais pu retrouver qu'un ordre de sensibilité inférieur à celui de la méthode originale de Rath et Krantz, avec une valeur d'environ $0,7 \mu \text{eq/l}$.

La réaction exige une verrerie absolument nette, une eau bidistillée très pure, qui demande à être contrôlée ainsi que les réactifs, par un essai à blanc à chaque opération.

§

Une fraction seulement des nitrites détectés de cette manière peut expliquer la faiblesse de ces résultats. Nous avons été amenés ainsi à envisager la mise en évidence indirecte d'une autre fraction par la détermination d'une méthémoglobinémie éventuelle.

§

b) Recherche indirecte

Dosage de la méthémoglobine par la méthode spectrophotométrique d'EVELYN et MALLOY (24).

Principe :

La bande d'absorption caractéristique que présente la méthémoglobine à $635\text{ m}\mu$ disparaît presque complètement par addition à la solution de méthémoglobine d'une solution de cyanure de sodium. La diminution de la densité optique est proportionnelle à la concentration en méthémoglobine : elle est mesurable au spectrophotomètre. La totalité de l'hémoglobine présente dans la solution est transformée en méthémoglobine cyanée dont le maximum d'absorption se situe à $540\text{ m}\mu$. La concentration de ce pigment est déterminée par la mesure de la densité optique à cette longueur d'onde.

Réactifs :

- 1) Mélange tampon de Sorensen : phosphate disodique et monopotassique 0,067 M ajusté à pH 6,6.
- 2) Tampon 0,016 M obtenu par dilution.
- 3) Solution de ferricyanure de potassium à 20 %.
- 4) Solution de cyanure de sodium à 10 %.
- 5) Solution neutralisée de cyanure de sodium préparée extemporanément en mélangeant à parties égales :
 Solution de cyanure de sodium à 10 %
 Acide acétique à 12 %.

Diluer 0,4 ml de sang dans 10 ml de tampon phosphate 0,016 M.

Après cinq minutes de contact faire une lecture à $635\text{ m}\mu$.

Soit L 1 la densité optique lue. Ajouter à la solution une goutte de solution de cyanure de sodium neutralisée (R 5). Après deux minutes faire une nouvelle lecture à $635\text{ m}\mu$. Soit L 2 la densité optique déterminée. La différence L 1 - L 2 est proportionnelle à la concentration en méthémoglobine. Diluer 2 ml de la solution sanguine au vingt cinquième dans 8 ml de tampon phosphate 0,067 (R 1). Ajouter une goutte de ferricyanure de potassium (R 3) et attendre

deux minutes pour que toute l'hémoglobine soit transformée en méthémoglobine. Ajouter alors une goutte de solution neutralisée de cyanure de sodium (R 5) et deux minutes après mesurer l'absorption à 540 m .

Le témoin est réalisé par 10 ml de solution tampon contenant une goutte de la solution de ferricyanure.

Soit L 3 la densité optique déterminée par cette dernière lecture. L'étalonnage d'un spectrophotomètre type Jobin et Yvon à l'aide d'une solution pure d'hémoglobine nous a permis d'établir les deux équations suivantes :

Hémoglobine en g. pour 100 ml de sang :

$$\frac{100 \times L 3}{5,26}$$

Méthémoglobine en g. pour 100 ml de sang :

$$\frac{(L 1 - L 2) \times 100}{7,33}$$

Cette technique permet de déceler une méthémoglobinémie de 1 à 2 p.100.

CHAPITRE II.2

II.2. - ETUDE DU METABOLISME

DES NITRATES ALCALINS

RESULTATS

II.2.1. - ESSAI DE REDUCTION IN VITRO PAR LES TISSUS ANIMAUX

Avant d'étudier le sort du nitrate introduit dans l'organisme naturellement, ou artificiellement après surcharge, il nous a paru opportun de préciser son comportement in vitro en présence de certains tissus.

BERNHEIM et DIXON (9) ont montré que le nitrate est réduit en nitrite par de nombreux tissus, en particulier par le muscle et surtout le foie. En utilisant leur mode opératoire sur des foies de souris, nous avons procédé à différents essais en aérobie et anaérobie sous huile de paraffine.

Les foies, soigneusement lavés pour éliminer toute trace d'hémoglobine, sont finement broyés au mortier avec du sable lavé et une solution de tampon phosphate 0,067 M de pH 7,2 dans les proportions une partie de tissu pour deux parties de solution tampon. Pour la conduite de l'essai nous avons utilisé 5 ml de suspension tissulaire, 5 ml de tampon, 10 ml d'une solution contenant 1 meq. de nitrate. On porte à 37°C. Durant 3 heures, des prélèvements sont effectués toutes les trente minutes. Les protéines tissulaires sont éliminées par défécation hydrozincique et les nitrites éventuellement apparus au

cours de l'incubation à 37° C, sont dosés dans le filtrat par colorimétrie.

Plus récemment, HEPPEL et HIIMOE (33) (34) ont proposé un mode de préparation quelque peu différent :

Les foies lavés sont homogénéisés avec 5 volumes d'acétone froid; après filtration sur vide, le résidu est traité à nouveau par l'acétone et séché sous courant d'air. La poudre acétonique ainsi obtenue est utilisée de la même manière dans le tampon phosphate 0,067 M.

Nous avons utilisé ces deux techniques et dans les deux cas il ne nous a pas été possible de retrouver une quelconque activité de réduction de ces extraits cellulaires.

II.2.2. - MODE D'ELIMINATION DES NITRATES (16)

Deux types d'essais ont été réalisés. Dans un premier temps nos recherches ont porté sur les concentrations de nitrate d'origine exclusivement alimentaire, normalement présentes dans le sang, l'urine et la salive et nous avons tenté de préciser en particulier la quantité urinaire éliminée. Dans un deuxième temps une série de surcharges ont été réalisées à l'aide de nitrate de sodium à la dose de 500 mg (5,9 meq.) administré en cachets chez des sujets à jeun par voie orale avec 50 ml d'eau. A cette concentration, on peut assimiler l'essai à un apport alimentaire de nitrates et estimer que les conditions physiologiques ne sont pas modifiées. Les sujets sont restés à jeun durant les quatre premières heures et les dosages ont été effectués sur des prélèvements d'urine, de sang et de salive récoltés à intervalles déterminés au cours des vingt-quatre heures qui suivent l'administration.

1) Elimination "normale" des nitrates

- nitrates et nitrites sanguins

L'essai, conduit sur 25 sujets d'une même collectivité, soumis au même régime, a montré une distribution

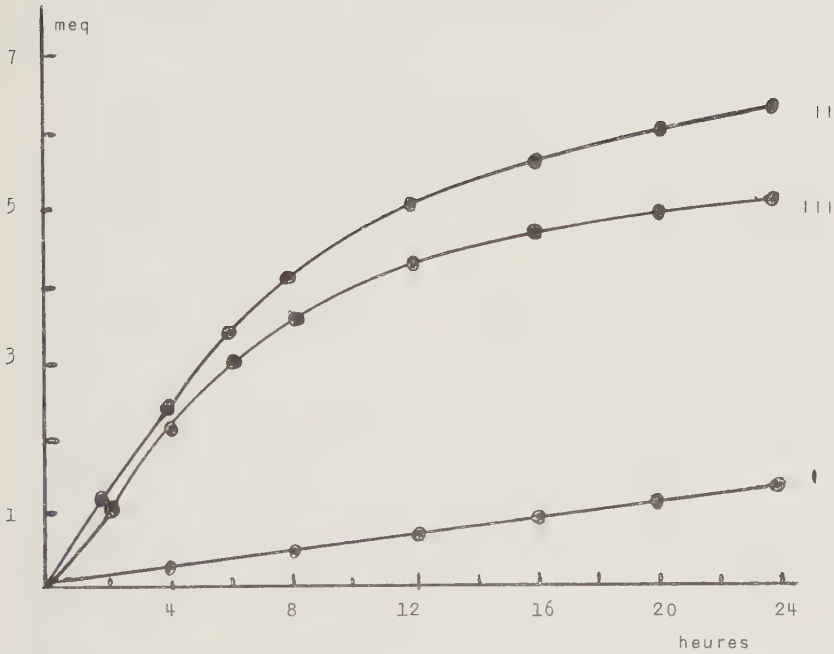


Fig. 1 : Variation de l'élimination des nitrates en fonction du temps.

- I - Variations nycthémérales
- II - Après surcharge
- III - Elimination réelle de la dose administrée

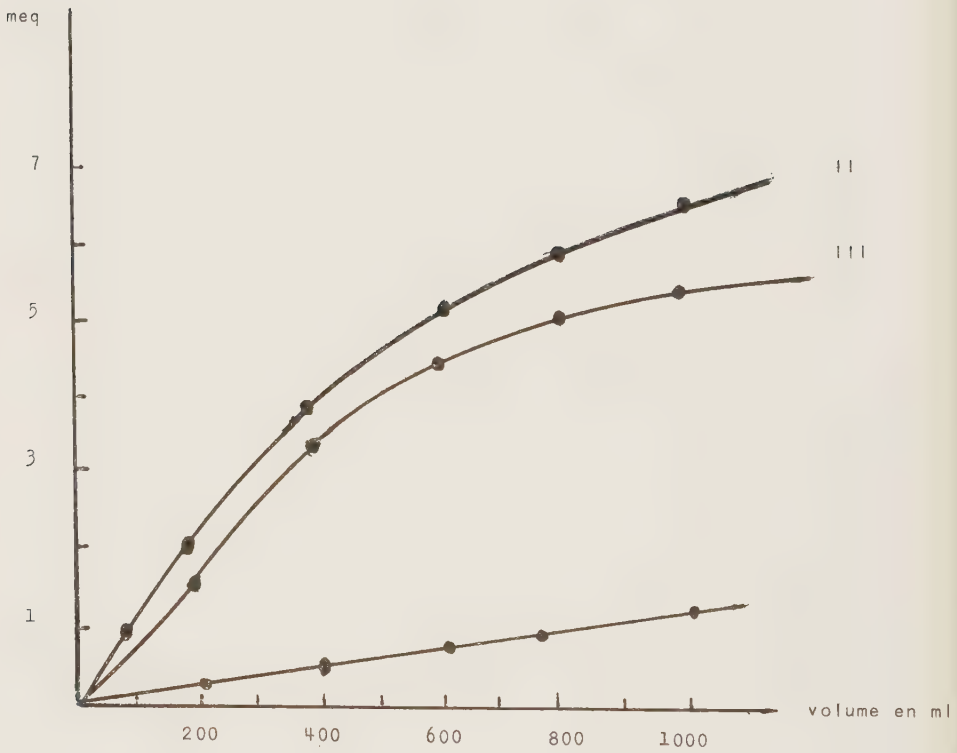


Fig. 2 : Variation de l'élimination des nitrates en fonction du volume émis (10 sujets).

I - Variations nycthémerales

II - Après surcharge

III - Élimination réelle de la dose administrée

asymétrique des taux de la nitratémie qui est comprise entre 0 et $10 \mu\text{eq/l}$ avec une valeur médiane voisine de $3 \mu\text{eq}$.

Les nitrites sanguins ont été dosés chez 34 sujets: quelle que soit l'heure du prélèvement, l'ion nitreux n'a été décelé qu'à des taux voisins de $0,7 \mu\text{eq/l}$ (84 p. 100 des cas). Les valeurs trouvées correspondent à la limite de sensibilité de notre technique de dosage et sont toujours très nettement inférieures à celles annoncées par les auteurs ($2,3 \mu\text{eq/l}$).

- nitrates et nitrites urinaires

L'élimination globale des nitrates a été déterminée dans les urines de vingt-quatre heures d'une cinquantaine de sujets.

L'intervalle de distribution est de 0,35 à 3,5 meq. avec une valeur médiane de 1 meq. dans 60 % des cas.

La présence de nitrites urinaires n'a pu être mise en évidence. Les variations nyctémérales des nitrates (sur 10 sujets) ont été précisées dans des échantillons d'urines collectés régulièrement toutes les deux heures pendant la journée et à intervalles plus espacés jusqu'à la vingt-quatrième heure. Exprimée en totaux cumulatifs la représentation graphique de cette élimination en fonction du temps et du volume émis est une fonction linéaire. (Fig. 1) - (Fig. 2).

- nitrates et nitrites salivaires

Les taux de nitrates salivaires, déterminés chez 10 sujets, sont pratiquement nuls, eu égard à la sensibilité de la technique de dosage utilisée, même au cours de la période post-prandiale, c'est-à-dire après l'apport alimentaire de nitrates.

Les nitrites par contre ont été décelés dans tous les cas : à jeun leur concentration est en moyenne de $0,065 \text{ meq/l}$ ($\pm 0,024$) (*). En période digestive, elle

(*) Cette valeur représente l'intervalle de sécurité de la moyenne pour un coefficient de probabilité de 0,05.

augmente notablement pour atteindre les valeurs de 0,191 ($\pm 0,047$), 0,193 ($\pm 0,045$) et 0,139 ($\pm 0,051$) meq/l respectivement 2, 3 et 4 heures après le début du repas.

Sujets	à jeun en meq/l.	en période digestive en meq/l.		
		2 h.après	3 h.après	4 h.après
1	0,070	0,119	0,945	0,098
2	0,080	0,150	0,101	0,098
3	0,084	0,147	0,196	0,147
4	0,101	0,241	0,210	0,168
5	0,084	0,150	0,224	0,182
6	0,077	0,298	0,385	0,245
7	0,105	0,255	0,353	0,2765
8	0,052	0,234	0,143	0,73
9	0	0,252	0,196	0,084
10	0	0,066	0,033	0,021

Concentration des nitrites salivaires à jeun et en période digestive

- Concentration sanguine - Rapport erythro-plasmatique

La diffusion des nitrates est extrêmement rapide et permet de les déceler dans le sang, trente minutes après l'absorption, mais la nitratémié demeure toujours très faible avec cependant une valeur maximale au bout de 3 heures (fig. 3).

Sur l'un des sujets les taux observés sont les suivants :

Temps	Concentration en meq/l.
30 mn	0,17
1h 30 mn	0,25
3 h	0,35
5 h	0,21
9 h	0,19

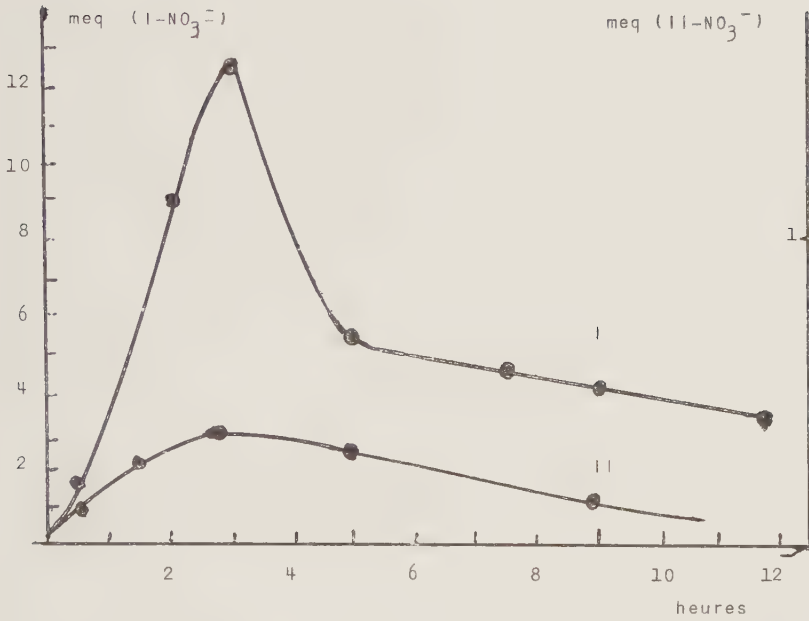


Fig. 3 : Concentration sanguine et élimination urinaire des nitrates en fonction du temps après surcharge en nitrate de sodium (5,9 meq.)

I - nitrates urinaires

II - nitratémie

Compte-tenu de la sensibilité de la technique, aucune méthémoglobinémie n'a pu être mise en évidence dans les 6 heures qui suivent l'ingestion de nitrate.

L'ion nitrique pénètre cependant dans les hématies : le rapport érythroplasmatique a été déterminé in vitro à 37° C. sur du sang hépariné (9 ml) mis en contact avec une solution à 0,5 p.100 de nitrate de sodium ou de potassium (1 ml) :

Les résultats sont réunis ci-dessous :

Temps en mn	Teneur en nitrates des hématies en % de la quantité totale	Teneur en nitrates du plasma en % de la quantité totale	Rapport erythro- plasmatique
30	32 - 33	67 - 68	0,50
60	32 - 33	67 - 68	0,50

Rapide, le passage de l'ion nitrate dans les globules est cependant limité. La diffusion de l'anion n'est pas influencée par le type de sel utilisé (NaNO_3 , KNO_3) et dans ces deux cas sa répartition est identique à celle de chlore.

- Elimination urinaire

Plus de 90 p.100 des nitrates administrés sont éliminés par les urines de 24 heures (Fig. 1 et 2) (Moyenne de 10 sujets).

Le tracé des courbes (I) et (II) exprimant les résultats sous forme de totaux cumulatifs en fonction du temps et du volume émis est presque superposable; on note dans les deux cas une élimination importante dans les 8 premières heures. La portion de courbe initiale (II) qui présente un léger point d'inflexion correspondrait aux phénomènes d'absorption suivant les conceptions de LAPP.

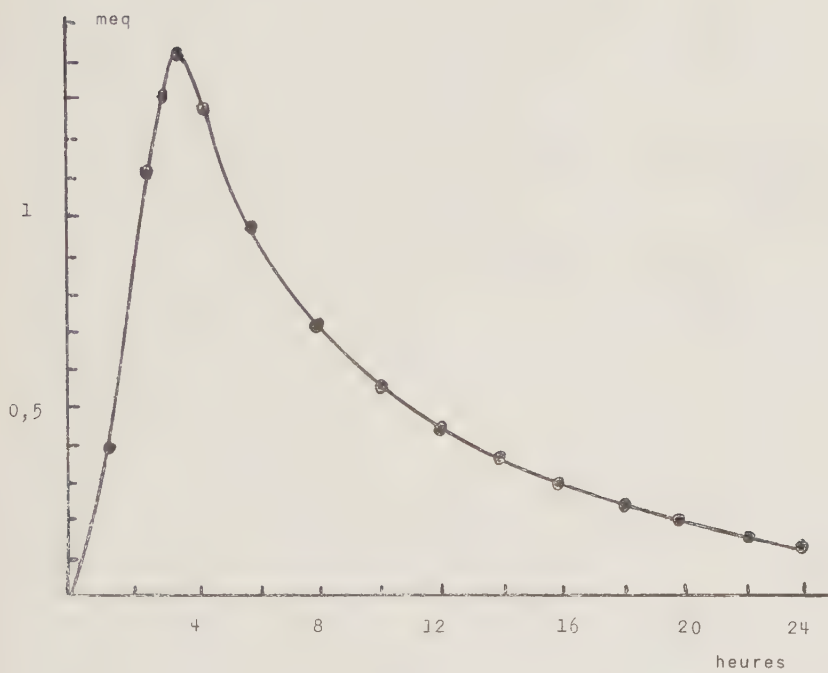


Fig. 4 : Débit moyen en fonction du temps
(moyenne de 10 sujets)

Si l'on étudie le débit moyen en fonction du temps (sur 10 sujets) par intervalles de miction de une heure, puis de deux heures, l'élimination maximale se situe aux environs de la troisième heure. (Fig. 3 et 4).

Aucune trace de nitrite n'a pu être décelée dans l'urine au cours de ces essais.

- Elimination salivaire

Les nitrates passent dans la salive, principalement dans les deux à trois premières heures qui suivent leur administration orale. Si leur concentration maximale, à la deuxième heure, n'est en moyenne (sur 5 sujets) que de 1,5 meq/l, on note parallèlement une augmentation importante des nitrites salivaires qui se maintiennent à des taux plus que vingt fois supérieurs à la normale (entre 3,5 et 2,5 meq/l) pendant au moins cinq heures (fig. 5). On constate donc qu'il y a une corrélation directe entre l'apport de nitrate alimentaire ou non, et le taux de nitrite salivaire apparu. Cette notion nouvelle, nous semble-t-il, se trouve confirmée par l'épreuve de surcharge.

Il semble qu'on puisse envisager deux mécanismes possibles pour expliquer cette élimination des nitrites : soit une action purement enzymatique propre à la glande salivaire ou à une "nitrate réductase" que l'on retrouverait dans la salive totale, soit une réduction liée à la présence de germes normaux de la salive. Il ne nous a pas paru dénué d'intérêt de tenter de préciser l'origine possible de cette réduction en opérant de la façon suivante:

Dans un premier temps pour éliminer l'interaction possible des germes, nous avons additionné le milieu d'un mélange pénicilline-streptomycine. Des échantillons moyens de salive sont prélevés à jeun, ce qui élimine la présence des nitrates et réduit au minimum le taux des nitrites préexistant. Les échantillons additionnés d'antibiotiques sont ensuite mis au bain-marie à 37° C en présence d'une quantité connue de nitrate et des prélèvements effectués à intervalles réguliers permettent de préciser l'apparition éventuelle des nitrites. Aucune réduction n'a été notée en 6 heures et le taux des nitrates est resté stable. En fait, nous n'avons pu préciser ainsi un mode

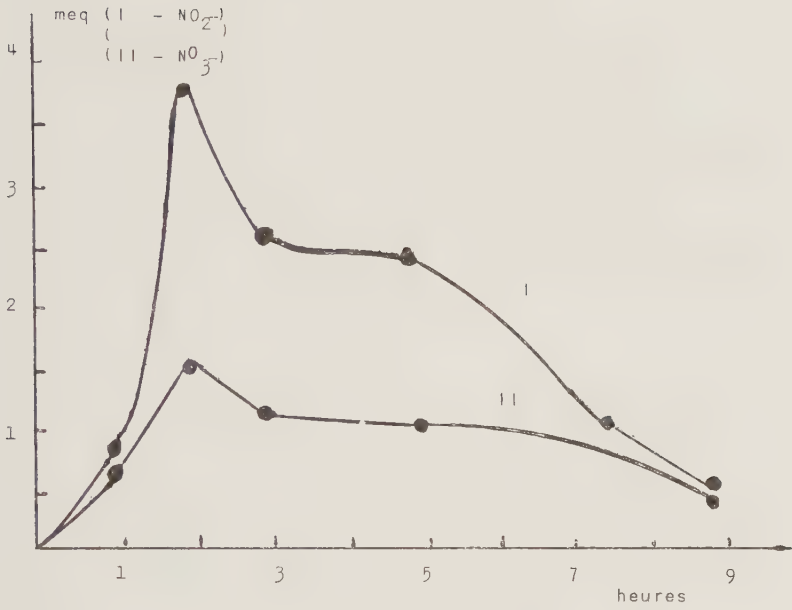


Fig. 5 : Concentration des nitrates et nitrites salivaires en fonction du temps après surcharge en nitrate de sodium (5,9 meq.)

I - nitrites salivaires

II - nitrates salivaires

d'action propre à la glande salivaire ou à la salive, car si les antibiotiques inhibent normalement les germes, l'activité d'un enzyme type "nitrate réductase" peut être de son côté gênée ou arrêtée par la présence de ces mêmes antibiotiques.

Aussi, dans un deuxième temps, nous sommes-nous contentés d'opérer sans antibiotiques. Nous n'avons pu détecter dans les deux heures qui suivent qu'une quantité extrêmement faible de nitrites (à la limite de sensibilité de notre technique) et dans tous les cas très inférieure à celle observée in vivo précédemment, la concentration en nitrate restant pratiquement constante pendant ces deux heures.

2) Elimination des nitrates après surcharge (Injection)

En fonction des résultats obtenus et dans le cadre de cette étude, il ne nous a pas paru inutile de tenter de préciser la nature de l'élimination de ce sel et plus particulièrement de déterminer la valeur des filtrations glomérulaires et tubulaires. Nous avons étudié l'excrétion du nitrate de sodium en fonction du volume urinaire et calculé sa "clearance" (*). On sait que la détermination d'une clearance implique pour la substance considérée, certaines propriétés que nous rappellerons brièvement :

- Etre éliminée en presque totalité par le rein,
- Etre peu ou pas métabolisée dans l'organisme,
- Etre diffusible, mais la concentration sanguine restant suffisamment prolongée et constante pour permettre une observation précise,
- Etre facilement dosable et avec assez de précision pour limiter les quantités à injecter,
- Ne pas être toxique.

(*) Le terme anglo-saxon de "clearance" désigne le volume de sang que le rein est capable de débarrasser d'une substance en un temps déterminé

Ces différents impératifs se trouvant réalisés pour les nitrates alcalins, nous avons adopté le mode opératoire suivant avec du nitrate de sodium.

Après évacuation complète de la vessie, par miction orthostatique, recueillir les urines qui constituent l'échantillon n° 1 d'urine (blanc urinaire). Faire absorber 200 ml d'eau et prélever 10 ml de sang sur héparine (échantillon n° 1 de sang). Injecter par voie intra-veineuse 10 ml d'une solution contenant 500 mg de nitrate de sodium. Noter l'heure de la fin de l'injection. Trente minutes après la fin de l'injection, faire évacuer totalement la vessie. Noter l'heure de la miction et procéder, immédiatement après, à la deuxième prise de sang (échantillon n° 2 de sang).

Soixante minutes après la fin de l'injection, faire de nouveau vider la vessie. Recueillir les urines en totalité (échantillon n° 2). Noter l'heure de la miction et procéder, immédiatement après, à la troisième prise de sang (échantillon n° 3). On évalue la teneur des échantillons d'urines n° 2 et 1 et de sang n° 1, 2 et 3, les échantillons 2 et 3 permettant de calculer le taux moyen sanguin pendant la clearance et par rapport à l'échantillon n° 1. La détermination de la clearance s'effectue suivant la formule générale :

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

C = clearance en ml

V = diurèse en ml/mm

U = concentration urinaire de nitrate de sodium
(mg/100 ml)

P = concentration sanguine moyenne de nitrate de sodium
(mg/100 ml)

Résultats :

Sur une douzaine de sujets normaux et présumés sains du point de vue rénal, les clearances trouvées ont été en moyenne de 58 ml/mm dans 75 p.100 des cas avec des valeurs extrêmes de 75 et 44 ml/mm.

Chez trois sujets la diurèse en trente minutes étant inférieure à 2 ml/mn, nous avons adopté, comme dans le cas de la clearance standard de Van Slyke, la formule :

$$C = \frac{U \sqrt{V}}{P}$$

où le volume V d'urine émise par minute ne figure plus pour sa valeur absolue, mais seulement sous la forme de la racine carrée de ce volume.

Si l'on admet une valeur de 130 ml/mn pour le filtrat glomérulaire, toute substance dont la clearance est inférieure au volume de ce filtrat doit être réabsorbée par les tubuli; c'est le cas de l'urée dont la clearance maximale est de 75 ml/mn et la clearance standard de 54 ml/mn. Dans le cas du nitrate de sodium, la clearance serait du même ordre que celle de l'urée, et, comme cette dernière, l'ion nitrate doit, être réabsorbé à environ 50 p.100 au niveau des tubuli.

Il eut été logique de poursuivre ces recherches en comparant les valeurs de ces deux clearances dans certains cas pathologiques. Pour des raisons indépendantes de notre volonté, ces essais ont dû être limités à quelques albuminuries post-angineuses ou post-vaccinales. Certains sujets présentaient des signes d'atteinte rénale décelée par les examens classiques. Nous n'avons jamais pu confirmer par la clearance au nitrate une telle atteinte, mais il faut noter que les chiffres obtenus étaient toujours voisins de la valeur moyenne normale déterminée précédemment aussi bien pour le nitrate que pour l'urée.

CHAPITRE II.3

II.3. - DISCUSSION DES RESULTATS

D'après nos résultats nous avons montré que les nitrates apportés par le régime ou absorbés volontairement (test de surcharge), sont éliminés sous cette forme et en presque totalité dans les urines. La quantité éliminée quotidiennement est variable et en rapport direct avec le régime alimentaire. Dans les urines de vingt quatre heures les valeurs extrêmes trouvées se situent entre 0,35 et 3,5 meq chez une cinquantaine de sujets avec une valeur médiane de 1 meq dans 60 p.100 des cas, ce qui correspond à un apport alimentaire de 1,1 meq. Exprimée en totaux cumulatifs, la représentation graphique de cette élimination en fonction du temps et du volume émis est une fonction linéaire (Fig. 1 et 2).

Après surcharge, 90 p.100 des nitrates administrés sont éliminés par les urines de vingt quatre heures. Cette élimination, importante au cours des huit premières heures chez tous les sujets, présente un maximum aux environs de la troisième heure.

Si à l'état normal les concentrations sanguines et salivaires sont faibles ou même nulles, l'administration de 500 mg de nitrate de sodium s'accompagne d'une augmentation notable et rapide de la nitratémie et des nitrates salivaires. Les valeurs maximales atteintes, se situent entre la deuxième et la troisième heure, pour décroître lentement jusqu'à la huitième heure.

Bien que l'ion nitrate diffuse rapidement et sans doute dans tout l'organisme, aucun phénomène de rétention par les tissus n'a pu être constaté au cours de nos essais, contrairement à ce qui avait pu être observé par certains auteurs (88), (32). Dans le sang l'ion nitrite

a été constamment décelé à de très faibles doses ; même après administration de nitrates par voie orale ou intraveineuse, nous n'avons jamais pu mettre en évidence, compte-tenu des méthodes utilisées, une augmentation de nitrites sanguins dans les six heures suivant l'ingestion et il n'a pas été possible non plus de déceler une méthémoglobine, témoin indirect d'une nitritémie éventuelle.

Par contre, si le taux de nitrite sanguin semble, dans tous les cas assez constant avec des valeurs moyennes voisines de $0,7 \mu \text{eq/l.}$, leur production dans la salive suit constamment l'administration des nitrates. Ainsi après l'absorption de 500 mg de nitrate de sodium, on retrouve des quantités environ vingt fois supérieures à celles que l'on décèle habituellement en période digestive.

Cette donnée nous paraît être nouvelle et notre expérimentation pourrait apporter la preuve qu'il s'agit d'une réduction enzymatique cellulaire au niveau des glandes salivaires ou de la salive totale car nous avons montré que si les microorganismes de la bouche interviennent dans cette formation, c'est d'une façon extrêmement réduite. (*)

D'une manière générale, l'absence de réduction par les tissus, en dehors des acini salivaires est en accord avec les conclusions de KEITH (41) chez l'homme et GREEN (32) chez le chien, mais différent de celles de KILGORE (44) et de KAMEOKA (40) respectivement sur le rat, le lapin et la chèvre.

(*) Nous venons de prendre connaissance, au moment de l'impression, qu'un article, publié par des auteurs anglo saxons (100), aboutit à des conclusions identiques à celles que nous avons émises dès 1960 en ce qui concerne la réduction des nitrates salivaires (16). Les auteurs précisent toutefois que le système enzymatique réduisant le nitrate se situe dans le sédiment salivaire, mais qu'il nécessite en outre des donateurs d'hydrogène se trouvant dans le surnageant. Le pH optimal de la réduction est voisin de 6,2, la présence d'oxygène n'influe que faiblement sur la réduction des nitrates, mais inhibe complètement la réduction ultérieure des nitrites.

Chez l'homme toutefois la réduction de l'ion nitrate n'a jamais été mise en évidence, si ce n'est dans des conditions particulières. In vitro la formation de nitrites a été constatée par différents auteurs (9), (33) après incubation de nitrates avec des cellules hépatiques. Mais malgré nos efforts, nos essais en ce sens, sur des foies de souris il est vrai, ce sont toujours avérés négatifs quelque soit le mode de préparation tissulaire utilisé. In vivo, la réduction de nitrates en nitrites a paru possible à certains (10, 33) étant donné la présence constante dans le sang de faibles traces de nitrites.

Nous avons décelé ce nitrite, mais à des taux très inférieurs à ceux annoncés et avec une constance toute relative. Si la mise en jeu d'enzymes tissulaires, principalement au niveau du foie, est vraisemblable, on ne doit pas négliger pour autant l'intervention de micro-organismes. Au niveau de l'intestin, une occlusion ou même un dysfonctionnement intestinal sont des circonstances favorisantes; ils permettent un contact prolongé et, par là même une attaque possible des nitrates par la flore microbienne. Une telle activité, avec ses dangereuses conséquences, peut se manifester également chez le nourrisson, qui réunit physiologiquement un certain nombre de conditions favorables (cf. chap. I.2).

Enfin, certaines affections urinaires, ou certaines maladies fébriles provoquées par des agents pathogènes, peuvent s'accompagner d'une élimination urinaire de nitrite.

Il semble toutefois possible d'envisager même chez l'adulte à l'état normal un métabolisme de l'ion nitrate comme en témoigne la présence de nitrites sanguins et salivaires; ces derniers réabsorbés par voie digestive étant peut-être à l'origine des nitritémies observées.

CONCLUSIONS

Nous nous sommes proposés dans ce travail :

- de rechercher une technique de dosage des nitrates applicable aux milieux biologiques, plus particulièrement le sang et l'urine.
- d'étudier le mode d'élimination et le métabolisme de l'ion nitrate ingéré naturellement avec la ration alimentaire ou de façon volontaire (test de surcharge).

1) La méthode utilisée est basée sur la réduction quantitative des ions nitrates en nitrites et la formation d'un azoïque coloré. Cette réduction, catalysée par un sel manganoux, s'effectue en milieu acide à $\text{pH} = 1$ avec de la poudre de zinc et en présence des réactifs de diazotation (acide sulfanilique) et de copulation (α -naphtylamine). Elle est utilisable pour ces concentrations, dans la prise d'essai, comprises entre 0,1 et 0,8 meq (2 à 10 μg d'azote). La précision est toujours voisine de 5 p.100, de l'ordre de celle admise par les auteurs.

2) Dans l'organisme, les résultats de nos recherches sur le devenir de l'ion nitrate, autorisent les conclusions suivantes :

- le nitrate absorbé avec l'alimentation est éliminé en quasi totalité par les voies urinaires. Les taux déterminés chez une cinquantaine de sujets se situent en moyenne autour de 1 meq/24 heures.
- Après surcharge (500 mg de nitrate de sodium par voie orale) 90 p.100 des nitrates administrés sont retrouvés dans les urines de 24 heures.

- Dans tous les cas, l'absorption est suivie d'une nette augmentation de nitrite salivaire alors qu'il n'a pu être mis en évidence une augmentation parallèle de nitrite sanguin ou une apparition de nitrite urinaire.
- Chez l'adulte, dans des conditions normales, la réduction au niveau salivaire ne représente qu'une partie infime des nitrates par rapport à la quantité totale mise en jeu, de toute manière sans aucune toxicité possible pour l'individu.
- L'ion nitrate est normalement réabsorbé par les tubuli rénaux, cette réabsorption tubulaire semble parallèle à celle de l'urée.

Le Président de la Thèse :

Pr. DREVON

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 9 Novembre 1961

VU, le Doyen :

H. HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ABELOUS (E.), GERARD (E.) - C.R.Acad. Sciences (1899), 129, 56.
2. ABELOUS (E.) - C.R.Soc. Biol. (1894), 46, 536.
3. ABELOUS (E.), ALOY (J.) - C.R.Soc. Biol.(1903), 55, 711.
4. ANDRE (L.) - Ann. Pharm. Fr. (1946), 4, 33.
5. Assoc. off. Agr. Chemist. "Official Methods of analysis" 7th. Ed. p.14 (1950).
6. AUBEL (E.) - C.R. Soc. Biol. (1937), 125, 12.
7. BACH (A.) - Biochem. Z., (1911), 31, 443.
8. BARNES (H.J.) - Analyst (1950), 75, 388.
9. BERNHEIM (F.), DIXON (M.) - Biochem. Z. (1928), 22, 125.
10. BLANC (P.) - Le nitrite de sodium. Imprimerie régionale Toulouse (1946), p. 35 et 78.
11. BLUM (L.) - Presse Med. (1920), 28, 685.
12. BORREL (F.) - Notes sur l'établissement d'études et de recherches météorologiques (1959), 6.
13. BOUISSOU (H.), CLAVERIE (P.), BIELSA (R.), LEVY (P.) Toulouse Med. (1956), 57, 239.
14. BUCKLIN (R.), MYINT (M.K.) - Ann. Intern. Med., (1960), 52, 703.
15. CHEYMOL (J.) - Ann. Pharm. Fr. (1945), 1, 30.

16. CIER (A.), ROUX (F.), NOFFRE (C.) - Bull. Soc.Pharm. Lyon (1960), 4, 115-122.
17. COMBY (H.H.) - J. Am. Med. Ass. (1945), 129, 112.
18. CORNBATH (M.), HARTMANN (A.F.) - J. Pediat.(1958), 33, 421.
19. DICKINSON (W.E.) - Anal. Chem. (1954), 26, 777.
20. DIXON (M.), THURLOW (S.) - Biochem. J. (1924), 18, 971.
21. EINSTERMANN (G.B.), KEITH (N.M.) - Med. Clin. North. America (1929), 12, 1489.
22. EVANS (H.J.), NASON (A.) - Arch. Biochem. Biophys. (1952), 39, 234.
23. EVANS (H.J.), NASON (A.) - J. Biol. Chem. (1953), 202, 655.
24. EVELYN (K.A.), MALLOY (H.T.) - J. Biol. Chem. (1938), 126, 655.
25. FEIGL (F.) - Spots tests in inorganic analysis. Elsevier Publ. comp. 5th Ed., 1958, 328.
26. FEIGL (F.) - Spots tests in inorganic analysis. Elsevier Publ. comp. 5th Ed., 1958, 326.
27. FEIGL (F.) - Spots tests in inorganic analysis. Elsevier Publ. comp. 5th Ed., 1958, 330.
28. FERRAND (P.) - J. Pediat. (1946), 29, 585.
29. FISCHER (F.L.), BERT (E.R.), BECKMAN (H.F.) -Anal. Chem. (1958), 30, 1972.
30. GALLAIS (F.) - Chimie minérale théorique et expérimentale. Masson Ed. Paris 1957.
31. GARNER (G.B.), BANN STARK (J.S.), MURHER (M.E.), PFANDER (W.H.) - Anal. Chem. (1956), 28, 1589.

32. GREEN (I.), HIATT (E.P.) - Am.J.physiol. (1954),
176, 463.
33. HEPPEL (L.A.), HILMOE (L.) - J. Biol. Chem. (1950)
183, 129.
34. HEPPEL (L.A.), HILMOE (L.) - Methods in Enzymology
Vol. II p. 402. Colowick (S.P.) et Kaplan (M.A.)
Academic Press. In. Publ. New-York 1955.
35. HOLLER (A.C.), HUCH (R.V.) - Anal. Chem. (1949),
21, 1385.
36. HORA (F.B.), WELLER (P.J.) - Analyst (1960), 85,
567.
37. JAEGGY (E.), LANZ (W.) - Schw. Med.Woch. (1935), 65,
363.
38. JOHNSON (C.M.), ULRICH (A.) - Anal. Chim. (1950),
22, 1526.
39. JONES (G.B.), UNDERDOWN (R.E.) - Anal. Chem. (1953),
25, 806.
40. KAMEOKA (K.), MORIMOTO (H.) - Bull. Natl.Inst. Agr.
Sci. Japan (1953), 6, 147.
41. KAUFMANN (J.) - Ann. Inst. Pasteur (1951), 81, 293.
42. KEITH (N.M.), WHELAN (M.), BANNICK (E.G.) - Arch.
Int. Med. (1930), 46, 797.
43. KELETI (I.), KAMENSKI (P.) - Gigiena i sant.(1959),
24, 65.
44. KILGORE (L.), ALMON (L.), GIEGER (M.) - J. Nutrition
(1959), 69, 39.
45. KOEPPÉ (H.W.), WAHL (W.D.) - Z. Klin. Med. (1957),
154, 587.
46. LAMBERT (J.L.), ZITOMER (F.) - Anal. Chem. (1960),
32, 1684.

47. LATIMER (W.M.) - The ozidation states of the elements and their potentials in aqueous solution. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. 2nd Ed. 1952.
48. LEES (H.) - Biochem. J. (1950), 47, XLIV.
49. LEMOIGNE (M.) - Exposés annuels de biochimie médicale, 1939, 2ème série p. 225.
50. LEWIS (D.) - Biochem. J. (1951), 48, 175.
51. LEWIS (D.) - Biochem. J. (1951), 49, 149.
52. LOISELEUR (J.) - Technique de laboratoire. Vol. "Chimie clinique" p. 224, Masson. Paris 2ème Ed. 1954.
53. MAZE (P.) - Bull. Acad. Med. (1943), 127, 378.
54. MEDINA (A.), NICHOLAS (D.J.D.) - Biochem. Biophys. Acta (1957); 25, 138.
55. MELLETE (S.J.), BRODSKY (W.A.), PALMER (L.) - J. Lab. Clin. Med. (1953), 41, 963.
56. MIDDLETON (D.) - Chem. and Ind. (1957), 34, 1147.
57. NASON (A.), ABRAHAM (R.G.), AVERBACH (B.C.) - Biochim. Biophys. Acta (1954), 15, 159.
58. NASON (A.), EVANS (H.J.) - J. Biol. Chem. (1953), 202, 655.
59. NELSON (J.L.), KURTZ (L.T.), BRAY (R.H.) - Anal. Chem. (1954), 26, 1081.
60. NICHOLAS (D.J.D.), NASON (A.) - Arch. Biochem. Biophys. (1954), 51, 311.
61. NICHOLAS (D.J.D.), NASON (A.) - J. Biol. Chem. (1954), 211, 183.
62. NICHOLAS (D.J.D.), NASON (A.), MC ELROY (W.D.) - J. Biol. Chem. (1954), 207, 341.

63. OKINAKA (Y.), SAKAI (K.) - Japan Analyst. (1954), 3, 228.
64. OMURA (H.) - Sci. Bull. Fac. Agr. Kuyshu Univers. (1954), 14, 423.
65. OMURA (H.) - Sci. Bull. **Fac.** Agr. Kuyshu Univers. (1957), 16, 225.
66. OMURA (H.) - Enzymologia (1959), 20, 271.
67. ORLOW (M.) - Amer. Chem. Analyst. (1904), 9, 117.
68. PAULING (L.) - The nature of the chemical bond. 3rd. Ed. Cornell University Press., 1960.
69. PESEZ (M.) - J.P.C. (1939), 29 460.
70. PESEZ (M.) - J.P.C. (1939), 30, 112.
71. RATH (M.), KRANTZ (J.C.) - J. of Pharm. and Exptl. Then. (1942), 76, 27.
72. RICHARD (J.) - Arch. Fr. Pediat. (1951), 8, 519.
73. RIEDER (L.), MELLON (A.) - Ing. Eng. Chem. Anal. Ed. (1946), 18, 96.
74. RIEHM (H.) - Zeits. Anal. Chem. (1930), 81, 439
cité par J.P.C. (1931), 14, 303.
75. ROUX (F.), NOFRE (C.), CIER (A.) - Bull. Soc. Pharm. Lyon, (1960), 4, 25-30.
76. .SATO (R.) - Symposium of inorganic nitrogen metabolism. Johns Hopkins Press. Ed., Baltimore (1956), 163.
77. SCHARDINGER (R.) - Zeit unters der nahrung und genus mittel. (1902), 5, 113.
78. SCHAUS (R.) J. Am. Med. Ass. (1956), 161, 528.
79. SILVER (W.S.), Mc ELROY (WD) - Arch. Biochem. Biophys. (1954), 51, 379.

80. STIEGLITZ (E.J.), PALMER (A.E.) - Arch. Inter. Med. (1937), 59, 620.
81. SWANN (M.H.), ADAMS (M.L.) - Anal. Chem. (1956), 28, 1630.
82. TARAS (M.J.) - Anal. Chem. (1950), 22, 1020.
83. VOERHOEVEN (W.) - Symposium of inorganic nitrogen metabolism. Johns Hopkins Press Ed., Baltimore (1956), 61.
84. WALTON (G.) - Amer. J. Pub. Health., (1951), 41, 986.
85. WESTLAND (A.D.), -LANGFORD (R.R.) - Anal. Chem., (1956), 28, 1996.
86. WEST (P.W.), SARMA (P.) - Mikrom. Acta. (1957), 4, 506.
87. WEST (P.W.), LYLES (G.L.) - Anal. Chim. Acta. (1960), 23, 227.
88. WHELAN (M.) - Biochem. J. (1935), 29, 782.
89. WHELAN (M.) - J. Lab. Clin. Med. (1935), 20, 755.
90. WHELAN (M.) - J. Biol. Clin. (1930), 86, 189.
91. WILLIS (T.) - Pharmaceutical Rationalis. Dring, Harper et Leigh, London, 1679.
92. WOODWARD (P.) - Analyst. (1953), 78, 727.
93. YAMAFUGI (K.) - Nature, (1950), 167, 770.

94. YAMAFUGI (K.) - Nature, (1953), 171, 745.
95. YAMAFUGI (K.) , KONDO (H.), OMURA (H.)
Enzymologia (1950), 14, 153.
96. YAMAFUGI (K.), OSAJIMA (Y.), MOMURA (M.)
HATANO (S.) - Enzymologia (1960), 21, 245.
97. Nature (1960), 185, 162.
98. ZELLER (H.D.) - Analyst (1955), 80, 632.
99. ZUCKER (M.), NASON (A.) - J. Biol. Chem. (1955),
213, 463.
100. GOAZ (P.W.), BISWELL (H.A.) J. Dental. Research.
(1961), 40, 355. Cité par Chemical Abstracts
(1961), 55, 18934e.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
 <u>G E N E R A L I T E S</u>	
<u>CHAPITRE I.1. - RAPPEL PHYSICOCHIMIQUE SUR LES</u> COMPOSES MINERAUX DE L'AZOTE	7
I.1.1. - Le degré d'oxydation des composés minéraux de l'azote	7
I.1.2. - Les structures électroniques des composés minéraux de l'azote	8
I.1.3. - Propriétés physicochimiques des nitrates et des nitrites	10
 <u>CHAPITRE I.2. - LA REDUCTION DES NITRATES EN</u> BIOLOGIE	15
I.2.1. - Chez les végétaux et les microorganismes	16
I.2.2. - Chez les animaux supérieurs	18
 <u>CHAPITRE I.3. - TECHNIQUES DE DOSAGE DES</u> NITRATES	27
I.3.1. - Méthodes basées sur des réactions de nitrification	28
I.3.2. - Méthodes basées sur des réactions d'oxydo-réduction	29
I.3.3. - Méthodes de réduction	30

RECHERCHES PERSONNELLES

<u>CHAPITRE II.1.</u> - TECHNIQUES UTILISEES	35
II.1.1. - Dosage des nitrates dans les milieux biologiques. Méthode proposée.....	35
II.1.2. - Dosage des nitrites dans les milieux biologiques.....	45
<u>CHAPITRE II.2.</u> - ETUDE DU METABOLISME DES NITRATES ALCALINS. RESULTATS.....	49
II.2.1. - Essai de réduction in vitro par les tissus animaux.....	49
II.2.2. - Mode d'élimination des nitrates.....	50
<u>CHAPITRE II.3.</u> - DISCUSSION DES RESULTATS.....	63
<u>CONCLUSIONS</u>	67
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	71

